

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: NPARA



Mgr. PETR SOUKAL

**Pátrání po pozůstatku plastidu v buňce
Rhabdomonas sp.**

Search for the remnant of plastid in the cell of
Rhabdomonas sp.

Diplomová práce

Školitel: Mgr. VLADIMÍR HAMPL, Ph. D.

2013

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli Mgr. Vladimíru Hamplovi, Ph. D. za připomínky a konzultace, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout, Mgr. Štěpánce Hrdé za tvorbu databáze a připomínky, Janě Szabové za vytvoření klonů kmene PANT2 a Anně Karnkowské za připomínky. Mé díky patří také Bc. Pavle Hanouskové za cenné připomínky a korektury chyb gramatických, stylistických i typografických.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze léta Páně 2013 dne 15. srpna

PETR SOUKAL v. r.

Abstrakt: Kmen Euglenozoa je tvořen čtyřmi skupinami – Euglenoidea (krásnoočka), Kinetoplastea (bičivky), Symbiontida a Diplonemea. Fototrofní krásnoočka, která tvoří dobře podpořenou skupinu, se vyznačují přítomností zeleného plastidu vzniklého sekundární endosymbiózou se zelenou řasou příbuznou dnešnímu rodu *Pyramimonas*. Obecně přijímaná teorie pozdního nabytí plastidu (*plastid-late hypothesis*) tvrdí, že k této endosymbióze došlo po oddělení fototrofních krásnooček od zbytku skupiny Euglenozoa. Endosymbiotická událost je vždy spojena s tokem genů z endosymbionta do jádra hostitele. I když dojde k úplné ztrátě endosymbionta lze předpokládat, že genom hostitele byl obohacen o geny endosymbiotického původu. Některé současné fylogenetické analýzy odhalily v genomu trypanosom (Kinetoplastea: Trypanosomatida) geny potenciálně plastidového původu. Interpretují to tak, že plastid byl přítomen již u společného předka bičivek a krásnooček a následně došlo k jeho ztrátě u všech bičivek a některých krásnooček, ke kterým patří i osmotrofní *Rhodomonas costata*. Během analýzy transkriptomu *R. costata* bylo nalezeno 63 genů, u nichž je možné předpokládat, že pocházejí ze zelených (14 genů) nebo jiných (49 genů) řas. Při konstrukci fylogenetických stromů byl jeden gen s vysokou podporou sesterský zeleným a čtyři geny s vysokou podporou sesterské jiným řasám. Protože genů sesterských zeleným řasám není víc než genů sesterských jiným řasám, nejedná se velmi pravděpodobně o geny endosymbiotického původu, takže teorie pozdního nabytí plastidu není vyvrácena.

Klíčová slova: Euglenozoa, Euglenoidea, *Rhodomonas*, endosymbiotický genový přenos, horizontální genový přenos, transkriptom.

Abstract: Phylum Euglenozoa consists of four groups – Euglenoidea, Kinetoplastea, Symbiontida and Diplonemea. Phototrophic euglenids, which constitute a clade, possess green plastid acquired via secondary endosymbiosis from green alga related to recent genus *Pyramimonas*. According to generally accepted plastid-late hypothesis, the endosymbiosis took place after split between phototrophic euglenids and all other euglenozoans. Endosymbiotic event is always associated with gene transfer from endosymbiont to nuclei of host. Even if the endosymbiont is completely lost we should be able to observe enrichment of the host genome with the genes derived from endosymbiont. Some recent phylogenetic analyses uncovered genes related to green algae in trypanosomas (Kinetoplastea: Trypanosomatida). Based on this observation, authors postulated a hypothesis that the plastid was present already in common ancestor of kinetoplastids and euglenids and was lost in kinetoplastids and some euglenids including osmotrophic *Rhodomonas costata*. During analysis of transcriptome of *R. costata* we found 63 genes, which could originated from green (24 genes) or other (49 genes) algae. In phylogenetic trees only one was robustly related to green and four were robustly related to other algae. Since the number of genes related to green algae is not higher than number of genes sister to other algae, we do not observed significant enrichment by green algal genes, and so the

plastid-late hypothesis is not rejected.

Keywords: Euglenozoa, Euglenoidea, *Rhabdomonas*, endosymbiotic gene transfer, horizontal gene transfer, transcriptome.

Úvod	6
1 Literární přehled	7
1.1 Endosymbióza a její role v evoluci eukaryot	7
1.1.1 Vznik mitochondrie	8
1.1.2 Primární endosymbióza plastidu	8
1.1.3 Sekundární endosymbiózy plastidu	10
1.1.3.1 Sekundární endosymbiózy zeleného plastidu	10
1.1.3.2 Sekundární endosymbiózy červeného plastidu	13
1.1.4 Terciární endosymbiózy plastidu	17
1.1.5 Zvláštní případy endosymbióz	17
1.2 Kmen Euglenozoa	18
1.2.1 Třída Symbiontida	20
1.2.2 Třída Kinetoplastea – bičivky	21
1.2.3 Třída Diplonemea	22
1.2.4 Třída Euglenoidea – krásnoočka	23
1.2.4.1 Fagotrofní krásnoočka	23
1.2.4.2 Fototrofní krásnoočka	24
1.2.4.3 Osmotrofní krásnoočka	25
1.2.4.4 Endobiotická krásnoočka	25
2 Cíle	27
3 Metodika	28
3.1 Kultivace krásnoočka <i>Rhabdomonas costata</i>	28
3.2 Světelná a elektronová mikroskopie	28
3.3 Izolace RNA	29

3.4	Sekvenace celkové RNA	30
3.5	<i>In silico</i> zpracování sekvenčních dat	30
3.5.1	Krok první – sekvenční analýza transkriptu (SAT)	32
3.5.2	Krok druhý – GetRidofBacteria (GRoB)	32
3.5.3	Krok třetí – STEPAdb	33
3.5.4	Krok čtvrtý – lokální BLAST (IBLAST)	33
3.5.5	Krok pátý – QBlastSorting (QBS)	33
3.5.6	Krok šestý – EachChoosenContigOwnFile (ECCOF)	35
3.5.7	Krok sedmý – GetChoosenFasta (GCF)	35
3.5.8	Krok osmý – GiveUniqueNameForFasta (GUNfF)	35
3.5.9	Krok devátý – AlignByMuscle (AbM)	35
3.5.10	Krok desátý – TrimmedByTrimAl (TbTA)	36
3.5.11	Krok jedenáctý – RAxML	36
3.5.12	Krok dvanáctý – konfrontace s literaturou	36
3.5.13	Krok třináctý – BestTrees	37
4	Výsledky	38
4.1	Světelná a elektronová mikroskopie	38
4.2	Fylogenetické analýzy	38
5	Diskuse výsledků	48
6	Závěry	50
A	Skripty použité v analýze	51
A.1	Krok druhý	51
A.2	Krok pátý	52
A.3	Krok šestý	54
A.4	Krok sedmý	54
A.5	Krok osmý	58
A.6	Krok devátý	59
A.6.1	Muscle	59
A.6.2	MAFFT	59
A.7	Krok desátý	60
	Literatura	61

Úvod

Plastid je buněčnou organelou, kterou můžeme najít ve všech zelených rostlinách, ruduchách i mikroskopických řasách. Jednou z nejdůležitějších funkcí plastidu je fotosyntéza – přetváření anorganických látek v látky organické, které mají nezastupitelný význam pro život jako takový.

Jedna dobře definovaná linie krásnooček nese ve svých buňkách sekundární plastidy pocházející z endosymbiózy se zelenou řasou. Kromě těchto fotosyntetických krásnooček však existuje mnoho heterotrofních, které plastid nemají. Sesterskou skupinu krásnooček tvoří bičivky (Kinetoplastea), zahrnující mimo jiné významné lidské parazity trypanosomy (*Trypanosoma*) a ničivky (*Leishmania*). Příbuzenský vztah bičivek a krásnooček vedl některé vědce k formulování atraktivní hypotézy raného nabytí plastidu u společného předka obou skupin a následné ztráty této organely u všech zástupců skupiny Euglenozoa s výjimkou skupiny fotosyntetických krásnooček. Endosymbióza je doprovázena endosymbiotickým přenosem genů (EGT). Přítomnost genů, které pocházejí ze zelených řas, může být pokládána za důkaz, že předek trypanosom měl plastid a skutečně existuje práce, která tvrdí, že takové geny v genomu trypanosom jsou. Avšak přítomnost takových genů můžeme vysvětlit také horizontálním přenosem genů (HGT) z potravy nebo okolního prostředí.

Pokud by byly u heterotrofních krásnooček nalezeny stejné geny příbuzné zeleným řasám jako u trypanosom nebo v případě, že by heterotrofní krásnoočka obsahovala zvýšené množství genů pocházejících ze zelených řas, pak by teorie raného nabytí plastidu získala podporu. U heterotrofních krásnooček však tyto geny ještě nikdo nehledal. To je jeden z důvodů, proč se hledání genů potenciálně plastidového původu v transkriptomu *R. costata* stalo tématem této práce. Nepřímá metoda, tedy detekce genů, byla navíc doplněna elektronovou mikroskopií, pomocí které jsme se chtěli přesvědčit, zda je v buňce našeho modelového organismu plastid nebo jeho rudiment přítomen či nikoliv.

1.1 Endosymbióza a její role v evoluci eukaryot

Jedním z pilířů dnešních představ o vzniku eukaryotické buňky jsou endosymbiotické teorie vzniku některých buněčných organel, zejména mitochondrií a plastidů. Prvním impulsem, který vedl k jejich vzniku, bylo pozorování německého botanika Andrease Franze Wilhelma Schimpera z roku 1883. Dělicí se chloroplasty mu připomínaly dělicí se sinice a navrhl v poznámce pod čarou vznik rostlin symbiózou dvou organismů (SCHIMPER 1883). Samotná endosymbiotická teorie vzniku chloroplastu byla poprvé popsána v roce 1910 ruským lichenologem Konstantinem Merežkovským (MERESCHKOWSKY 1910). Ve 20. letech 19. století byla endosymbiotická teorie poprvé použita pro vysvětlení vzniku mitochondrií (WALLIN 1923; WALLIN 1927). Až do roku 1967, kdy tyto teorie oživila Lynn Saganová (SAGAN 1967), nebyly endosymbiotické teorie vzniku organel brány příliš vážně.

Endosymbióza, jejíž nedílnou součástí je transfer genů mezi endosymbiontem a ektsymbiontem (hostitelem), není ukončený proces, probíhá neustále. Zatímco u mitochondrií se obecně předpokládá, že vznikly pouze jednou a to primární endosymbiózou, plastidy vznikaly pravděpodobně vícekrát, viz Obr. 1.1. Plastidy můžeme podle způsobu jejich vzniku dělit na primární, sekundární a terciární.

Kromě plastidů a mitochondrií patří k organelám, které mohly vzniknout endosymbiózou, kulovitá tělíska nalezená u některých druhů rozsivek (Ochromphyta: Bacillariophyceae), např. *Rhopalodia gibba* (GEITLER 1977), která jsou pravděpodobně zodpovědná za schopnost fixace dusíku těmito rozsivkami. Kulovitá tělíska jsou obalena dvěma membránami s četnými vchlípeninami vnitřní membrány a obsahují DNA. Molekulární analýza genu pro 16S rRNA ukázala na blízkou příbuznost kulovitých tělísek se sinicí rodu *Cyanothece* (PRECHTL, KNEIP et al. 2004).

Z dalších příkladů endosymbióz budiž uvedeny alespoň ty, které se týkají příslušníků kmene Euglenozoa: parazitická améba rodu *Neoparamoeba* (Amoebozoa: Dactylopodida) se svým endosymbiontem rodu *Perkinsiella* (Kinetoplastea: Prokinetoplastina) (DYKOVA, FIALA et al. 2003) a někteří zástupci rodu *Crithidia* a *Cryptobia* s bakteriál-

ním endosymbiontem rodu *Bordetella* (Betaproteobacteria: Burkholderiales) (HOLLAR, LUKES a MASLOV 1998; GADELHA, WICKSTEAD et al. 2005).

1.1.1 Vznik mitochondrie

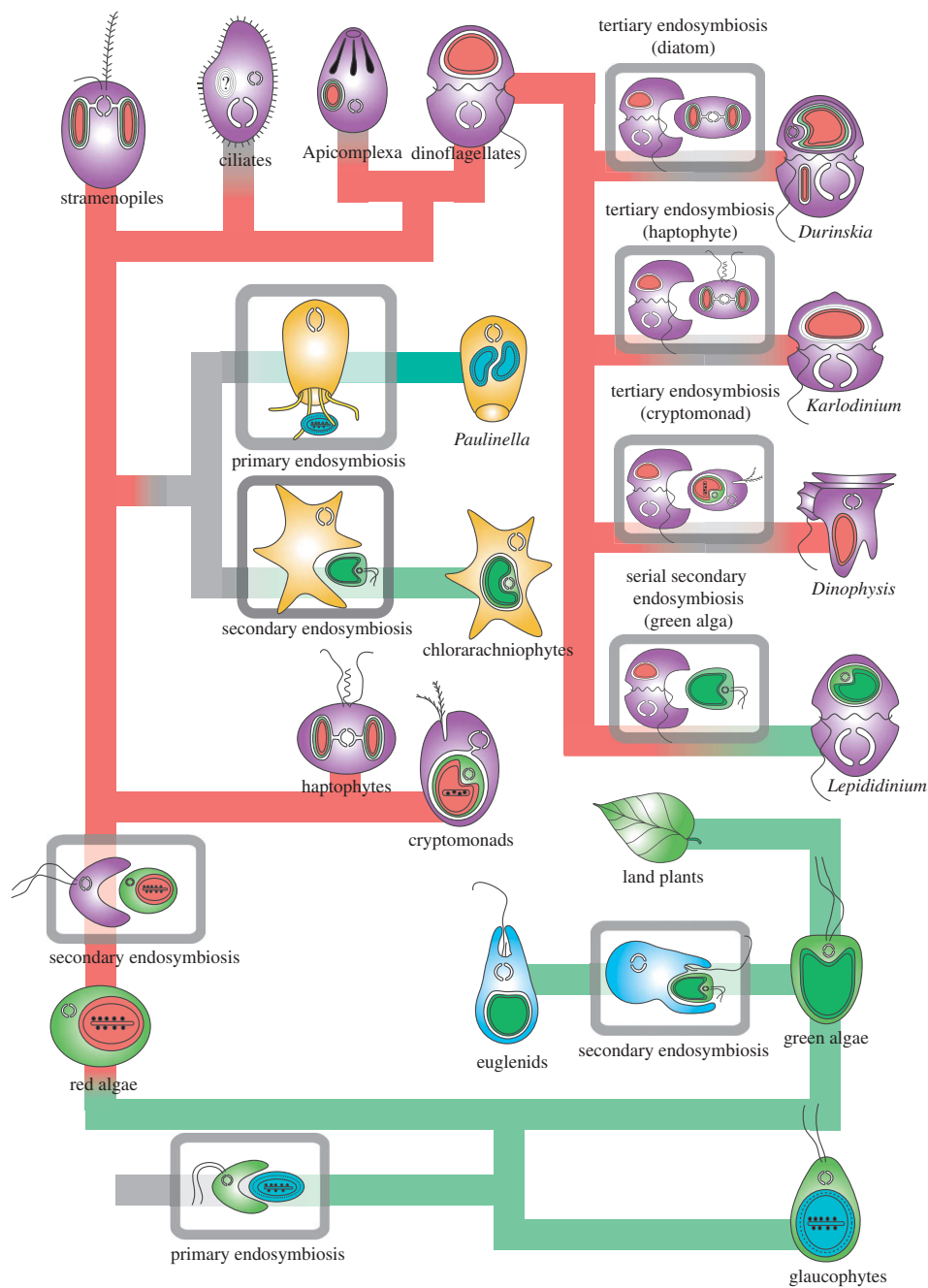
Podle endosymbiotické teorie se mitochondrie vyvinula z původně volně žijící bakterie, která byla pohlcena možná již eukaryotickou buňkou (CAVALIER-SMITH 2002). Obvykle se předpokládá, že mitochondriální endosymbióza proběhla v evoluci pouze jednou; ačkoliv u mitochondriím podobných organel – mitosomů a hydrogenosomů, které až na výjimky (AKHMANOVA, VONCKEN et al. 1998) nemají vlastní genom a neúčastní se energetického metabolismu – se o nezávislé endosymbióze uvažovalo (MULLER 1993). Dnes se však hydrogenosomy a mitosomy považují spíše za přímé potomky mitochondrie (BUI, BRADLEY a JOHNSON 1996; ROGER, CLARK a DOOLITTLE 1996; EMBLEY 2006). U jedné jediné skupiny eukaryot – Oxymonadea – se doposud nepodařila přítomnost mitochondriálních organel potvrdit (CARPENTER, WALLER a KEELING 2008).

Předkem mitochondrie, tj. onou pohlcenou bakterií, je podle dnešních teorií s největší pravděpodobností člen řádu Rickettsiales (Proteobacteria: Alphaproteobacteria) (WILLIAMS a SOBRAL 2007; FITZPATRICK, CREEVEY a MCINERNEY 2006). Není bez zajímavosti, že většina zástupců řádu Rickettsiales je intracelulárními endosymbionty, např. *Wolbachia* u skupiny Ecdysozoa nebo *Rickettsia* u člověka.

1.1.2 Primární endosymbióza plastidu

Předkem všech dnešních plastidů jsou s největší pravděpodobností sinice – červeno-modrozelené gramnegativní bakterie schopné fotosyntetizovat. Primární plastidy vznikají cestou primární endosymbiózy. Primární endosymbiózou obecně nazýváme proces, na jehož počátku se odehrává pohlcení organismu, který ještě nikoho nepohltil, organismem, který sám endosymbionta neobsahuje. V případě primárních plastidů, je pohlcovaným organismem (budoucím endosymbiontem a později i organelou) sinice a pohlcovatelem (budoucím ektosymbiontem) heterotrofní eukaryotická buňka. V dalším kroku, který je neukončený, se genetická informace sinice vytrácí z genomu endosymbionta do jádra ektosymbionta. S tím je spojen transport hotových proteinů, jejichž geny byly přeneseny do jádra ektosymbionta, do plastidu. Primární plastidy jsou tedy přímými potomky sinic. Všechny známé primární plastidy jsou obaleny dvěma membránami, které pocházejí ze sinice (KEELING 2013; KEELING 2010).

Primární plastidy recentně nacházíme u čtyř skupin organismů. U zelených rostlin (Viridiplantae), ruduch (Rhodophyta) a skupiny Glaucophyta se obvykle předpokládá, že jejich společný předek pohltit sinici. Glaucophyta obsahují rané plastidy – cyanely. Jsou podobnější sinicím, než jiné plastidy. Dokázaly si udržet peptidoglykanovou stěnu, a jsou tak jedinými samostatně osmoticky stabilními plastidy ve skupině Archaeplastida. Mezi zelenými rostlinami i ruduchami existují parazitické linie, které nefotosyntetizují, ale pozůstatky plastidu mají, např. holoparazitické rostliny (REVILL, STANLEY



Obrázek 1.1: Schéma primárních, sekundárních a terciárních endosymbióz plastidu napříč eukaryotickými organismy. Převzato z KEELING 2010.

a HIBBERD 2005) nebo *Holmsella* (EVANS, CALLOW a CALLOW 1973). V každém případě tato primární endosymbióza mohla podle některých autorů proběhnout asi před 1 600 000 000 let (YOON, HACKETT et al. 2004). Čtvrtou skupinu tvoří *Paulinella chromatophora* – sladkovodní améba patřící mezi Rhizaria (MARIN, NOWACK a MELKONIAN 2005). Plastid¹ améby, nazývaný chromatoforem, si zachoval peptidoglykanovou stěnu a byl získán asi před 60 000 000 lety (NOWACK, MELKONIAN a GLÖCKNER 2008). Nejblíže příbuzným *P. chromatophora* je fagotrofní *P. ovalis* (syn. *Calycomonas ovalis*), požírající právě sinice (BHATTACHARYA, PRICE et al. 2012). Nejblíže příbuznými chromatofory jsou sinice rodů *Prochlorococcus* a *Synechocystis* (YOON, NAKAYAMA et al. 2009).

Geny, které mají původ v sinicích, nalézáme v genomech téměř všech eukaryot (MARUYAMA, MATSUZAKI et al. 2009). Není tedy zcela vyloučena možnost, že primární endosymbióza se odehrála dříve, než se oddělila Archaeplastida od ostatních eukaryot (ANDERSSON a ROGER 2002), tj. že všichni zástupci eukaryot mají ve své minulosti předka obsahujícího plastid (ROGOZIN, BASU et al. 2009).

1.1.3 Sekundární endosymbiózy plastidu

Sekundární endosymbióza je proces, při kterém pohltní ektosymbiont endosymbionta, který již jednoho endosymbionta obsahuje. Pohlceným organismem může být tedy ruducha (Rhodophyta), zelená řasa (Viridiplantae), či zástupce skupiny Glaucophyta. Žádnou sekundární endosymbiózu se zástupci skupiny Glaucophyta však prozatím neznáme.

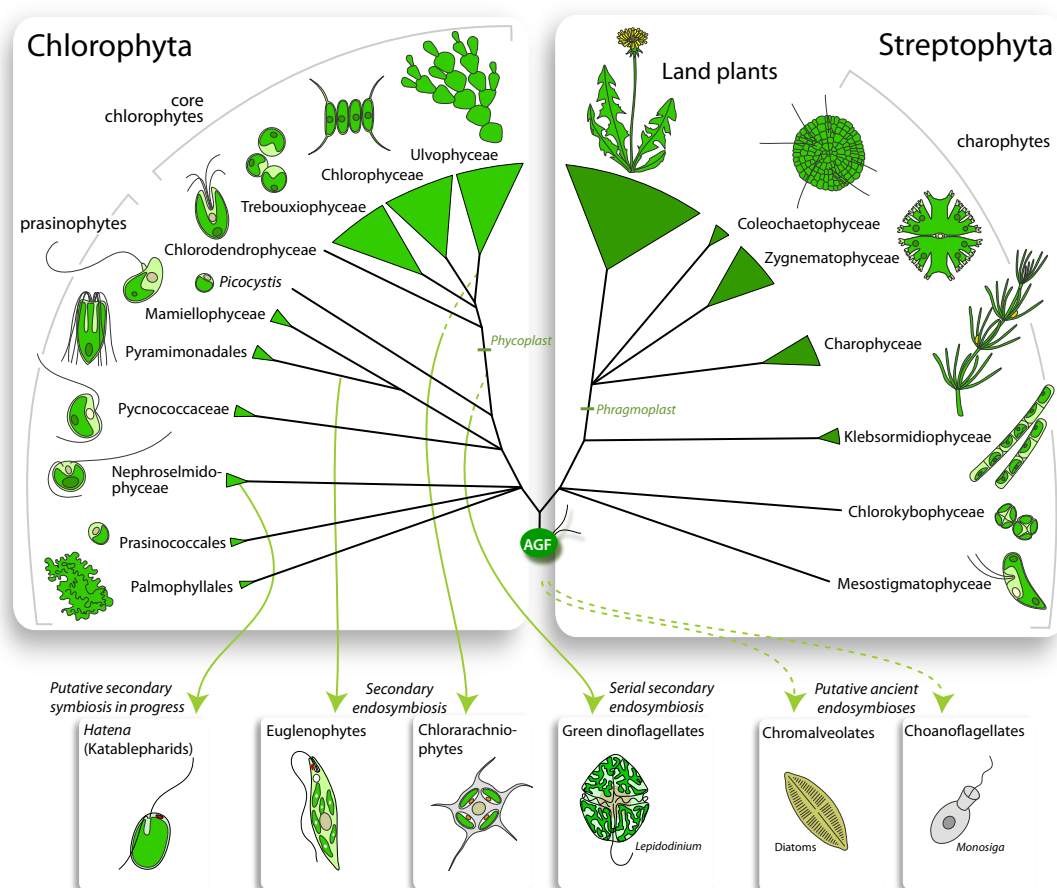
1.1.3.1 Sekundární endosymbiózy zeleného plastidu

Sekundární zelený plastid můžeme najít u některých krásnooček (Excavata: Euglenozoa), mořských měňavek málo početné skupiny Chlorarachniophyta (Rhizaria) a rodu *Lepidodinium* (Alveolata: Dinophyta). Dříve se uvažovalo o společném původu plastidu u Euglenozoa a Chlorarachniophyta, slučujícím tyto dvě skupiny (přesněji Discicristata a Cercozoa) do skupiny Cabozoa (CAVALIER-SMITH 1999). Molekulární analýzy však vypovídají proti této hypotéze.

Chlorarachniophyta

Do skupiny Chlorarachniophyta (SAR: Rhizaria: Cercozoa) patří necelá desítka druhů mořských fagotrofních améb, které obsahují několik sekundárních plastidů obalených čtyřmi membránami. Z evolučního hlediska je velmi zajímavý fakt, že součástí těchto plastidů je nukleomorf – redukované jádro endosymbionta. Genom nukleomorfu je rozdělen na tři chromosomy s velmi krátkými introny (17–20 bp). V případě druhu *Bigeloviella natans* obsahuje genom nukleomorfu 331 proteinových genů z nichž pouze

¹O tom, je-li endosymbiont žijící uvnitř buněk *P. chromatophora* hoden označení plastid proběhla vážná diskuse (THEISSEN a MARTIN 2006; BHATTACHARYA a ARCHIBALD 2006).



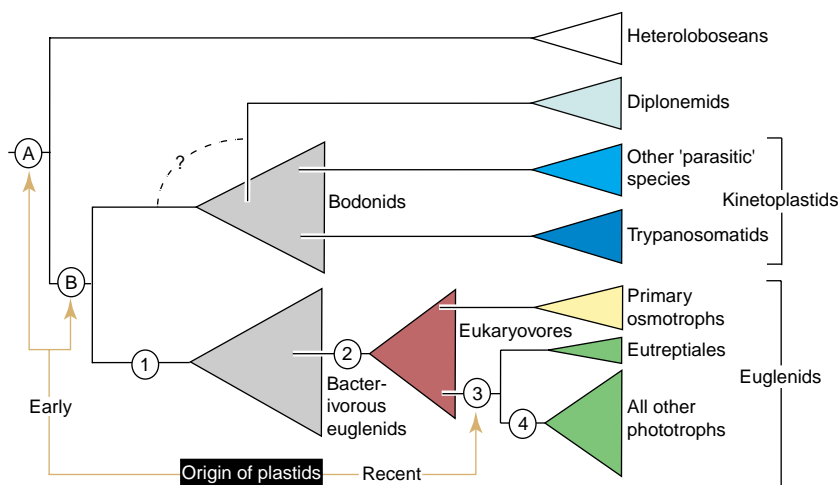
Obrázek 1.2: Přehled fylogeneze skupiny Viridiplantae. AGF – hypotetický, bičíkem obdařený předek zelené linie Archaeplastida. Převzato z LELIAERT, SMITH et al. 2012.

17 kóduje proteiny fungující v plastidu (GILSON, SU et al. 2006). K nejbližším příbuzným plastidu skupiny Chlorarachniophyta jsou řazení na základě fylogeneze v jádru kódovaného plastidového genu psbO (TAKAHASHI, OKABE et al. 2007) i 38 plastidových proteinů (ROGERS, GILSON et al. 2007) pravděpodobně zástupci tzv. UTC-větvě (Chlorophyta: Ulvophyceae, Trebouxiophyceae, Chlorophyceae), viz Obr. 1.2. K blízkým příbuzným hostitelských organismů (ektosymbiontů) náleží např. nádorovky (Plasmodiophoromycota, Phytomyxea) – intracelulární parazité rostlin (BASS, MOREIRA et al. 2005).

Pokud by byla skupina Chromista monofyletická, viz dále, pak by předkové skupiny Chlorarachniophyta ztratili červený plastid, aby jejich potomci v budoucnosti získali plastid zelený.

Euglenoidea – krásnoočka

Fototrofní krásnoočka (Euglenoidea) získala svůj plastid pohlcením jiné zelené řasy. Na základě fylogenetických analýz plastidových genů se nejčastěji uvádí, že nejbližším



příbuzným krásnoočího plastidu je *Pyramimonas parkeae* (Prasinophyceae: Pyramimonadales) (TURMEL, GAGNON et al. 2009), ačkoliv na základě fylogeneze v jádru kódovaného plastidového genu psbO vychází nejbližším příbuzným plastidu *Mesostigma* (Mesostigmatophyceae: Mesostigmatales) (TAKAHASHI, OKABE et al. 2007). Ektosymbiontem krásnoočí sekundární endosymbiomy byl, alespoň podle teorie pozdního nabytí plastidu (angl. *plastid-late hypothesis*), bičíkovec blízce příbuzný eukaryotickým rodům *Peranema* (MARIN, PALM et al. 2003) a *Rapaza* (YAMAGUCHI, YUBUKI a LEANDER 2012). Podporu této teorii dává také pozorování ultrastruktury cytoskeletu krásnooček. Zdá se, že pouze některá krásnoočka mají speciální adaptace, která jim umožňují pohlcování eukaryotické potravy. Pozůstatky těchto adaptací byly vysledovány u fotosyntetických krásnooček (LEANDER a KEELING 2004).

U některých z nejvíce zkoumaných zástupců řádu Trypanosomatida, tj. trypanosom (*Trypanosoma*) a ničivek (*Leishmania*), bylo nalezeno několik genů, které by mohly být barevného původu (HANNAERT, SAAVEDRA et al. 2003; OPPERDOES a MICHELS 2007; TÝC, LONG et al. 2010). To navozuje myšlenku raného nabytí plastidu u skupiny Euglenozoa (*plastid-early hypothesis*), tj. že plastid mohl získat už společný předek celé skupiny Euglenozoa (LEANDER a KEELING 2004; BODYL, MACKIEWICZ a MILANOWSKI 2010). Existují i práce zabývající se nabitím a ztrátou červeného plastidu v dávné minulosti (TRIPODI, BUTTIGLIERO et al. 2006). Srovnání teorie raného a pozdního nabytí plastidu u skupiny Euglenozoa je znázorněno na Obr. 1.3.

Třetím případem nezávislé zelené sekundární endosymbiózy jsou obrněnky rodu *Lepidodinium*. Předpokládá se, že *Lepidodinium* ztratilo původní sekundární obrněnčí plastid a posléze získalo nový. K nejbližším žijícím příbuzným tohoto nového plastidu

patří zástupci tzv. UTC-větvě zelených řas, tj. Ulvophyceae, Trebouxiophyceae a Chlorophyceae. Tato endosymbióza, nahrazení jednoho sekundárního endosymbionta jiným sekundárním endosymbiontem, nese označení seriální endosymbióza (MATSUMOTO, SHINOZAKI et al. 2011).

1.1.3.2 Sekundární endosymbiózy červeného plastidu

U několika eukaryotických skupin – Cryptophyta, Ochrophyta, Haptophyta, Dinophyta a Apicomplexa – dnes existuje (červený) sekundární plastid odvozený z ruduch (Archaeplastida: Rhodophyta). Na rozdíl od zelených sekundárních plastidů jsou červené sekundární plastidy, s výjimkou zástupců skupiny Apicomplexa, Dinophyta a Chromerida, napojeny endoplasmatickým retikulem na jádro ektosymbionta a obvykle obsahují chlorofyl *c*.

I v tomto případě existuje teorie, která se snaží vysvětlit původ červeného sekundárního plastidu jedinou endosymbiotickou událostí a všechny sekundárně červené taxony, včetně jejich heterotrofních příbuzných, shrnuje do skupiny Chromista (ať dříve kromě Rhizaria, či později včetně skupiny Rhizaria) (CAVALIER-SMITH 1999). Dnes se zdají pravděpodobnější teorie předpokládající vyšší počet červených endosymbiotických událostí.

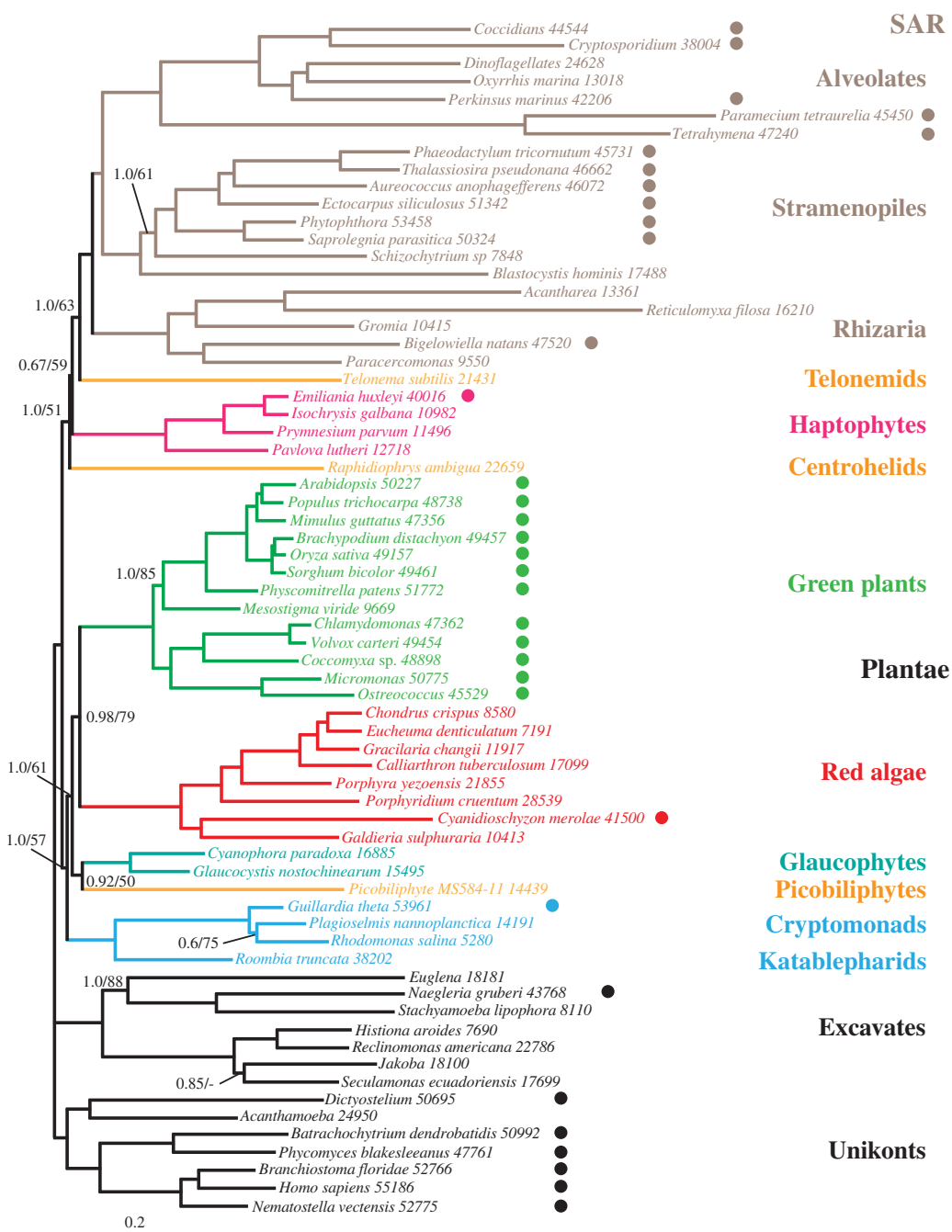
Plastidy zástupců skupin Haptophyta, Cryptophyta a Ochrophyta jsou obaleny čtyřmi membránami, z nichž nejvnějšnější je napojena na endoplasmatické retikulum, a tím i na jadernou membránu, a je osázena ribosomy. Dvě nejvnitřnější membrány jsou odvozeny od primárního plastidu, zatímco zbylé dvě pocházejí z endoplasmatického retikula ektosymbionta. Častou součástí plastidu zástupců obdařených bičíky je stigma, světločivný skvrna.

Ochrophyta

Skupina Heterokontophyta (angl. *stramenopiles*) je sdružením řady fotosyntetických i heterotrofních organismů. Podle některých studií je větev zahrnující všechny fotosyntetické příslušníky skupiny Heterokontophyta monofyletickou a zvana Ochrophyta (CAVALIER-SMITH a CHAO 2006; RIISBERG, ORR et al. 2009; YANG, BOO et al. 2012). Heterotrofní organismy pak tvoří dvě větve – Pseudofungi (např. Oomycetes: *Phytophthora infestans*) a Bigyra (např. *Blastocystis*).

Ochrophyta můžeme rozdělit do několika tříd, z nichž k nejvýznamnějším patří různobrvky (Xanthophyceae), chaluhy (Phaeophyceae) a rozsivky (Bacillariophyceae). Z morfologického hlediska je zajímavá také třída Eustigmatophyceae. Její zástupci mají jako jediná, s výjimkou krásnooček, extraplastidiální stigma a na rozdíl od ostatních červeným plastidem obdařených organismů jejich chloroplast neobsahuje chlorofyl *c*. Součástí třídy Dictyochophyceae je řád Pedinellales, jehož zástupci jsou jak autotrofní (např. *Pedinella*), tak heterotrofní (*Pteridomonas* a *Actinomonas*).

Některé zlativky (Chrysophyceae), např. *Uroglena*, jsou obligátně fagotrofní i fototrofní, obdobně jako krásnoočko *Rapaza viridis*, jiné plastid ztratily a jsou striktními



Obrázek 1.4: Fylogeneze eukaryot založená na alignmentu 258 genů. Uzly bez čísel mají absolutní podporu. Plné kruhy označují taxony s kompletně přečteným genomem. Číslo za každým taxonem vyjadřuje délku sekvence, která se podílí na alignmentu. Převzato z BURKI, OKAMOTO et al. 2012.

fagotrofy s kanibalistickými sklony, např. *Spumella* (YUBUKI, NAKAYAMA a INOUE 2008), či mají, i přes přítomnost plastidu, silné tendence ke kanibalismu, např. *Pterioochromonas* (CARON, PORTER a SANDERS 1990). U druhu *Ochromonas moestrupii* bylo při buněčném dělení pozorováno v několika málo případech nerozdělení plastidu, tj. jedna z dceřiných buněk zůstala plastidu prostá; přesto konzumovala bakterie a plavala jako buňka s plastidem (ANDERSEN 2011).

Cryptophyta – skrytěnky

Mezi skrytěnky (Cryptophyta) patří organismy fotosyntetizující i heterotrofní. S výjimkou zástupců rodu *Goniomonas* (Goniomonadales), kteří tvoří bazální skupinu skrytěnek a jsou fagotrofní (McFADDEN, GILSON a HILL 1994), mají všechny ostatní skrytěnky (Cryptomonadales) plastid, včetně ostatních heterotrofních zástupců ztrativších schopnost fotosyntézy. Zdá se, že schopnost fotosyntetizovat byla u skrytěnek ztracena nejméně třikrát nezávisle na sobě (HOEF-EMDEN 2005). Nenalezení barevných genů v zástupcích rodu *Goniomonas* by mohlo, např. snížit věrohodnost hypotézy Chromalveolata, resp. Hacrobia, které jsou založeny na existenci plastidu u společného předka skupin Chromista, resp. Hacrobia.

Součástí skrytěného plastidu je, obdobně jako u skupiny Chlorarachniophyta, nukleomorf se třemi chromosomy, které, v případě druhu *Guillardia theta*, obsahují 464 protein kódujících genů z nichž 30 funguje přímo v plastidu (MARTIN-CERECEDA, ROBERTS et al. 2010; DOUGLAS, ZAUNER et al. 2001). Kromě nukleomorfu se v periplastidiálním prostoru nacházejí 80S ribosomy a škrobová zrna (McFADDEN, GILSON a DOUGLAS 1994). Nukleomorf je obalen dvěma membránami a často přidružen k pyrenoidu. Dle nemnohých fylogenetických analýz LSU rRNA (velké ribosomální podjednotky) tvoří nukleomorf skrytěnek sesterskou linii ruduch (VAN DER AUWERA, HOFMANN et al. 1998), zvláště pak třídy Bangiophyceae (HOEF-EMDEN, MARIN a MELKONIAN 2002).

Haptophyta – haptěnky

Na základě fylogenetické analýzy plastidových genů se zdá, že blízkými příbuznými skrytěnek jsou zástupci skupiny Haptophyta (JANOUSKOVEC, HORÁK et al. 2010; RICE a PALMER 2006), ty pak spolu s několika heterotrofními skupinami tvoří taxon Hacrobia (OKAMOTO, CHANTANGSI et al. 2009). Naopak fylogenetické analýzy mnoha jaderných genů (BURKI, OKAMOTO et al. 2012) rozděluje Hacrobia na část sesterskou Harosa², tj. Telonemida, Centrohelida a Haptophyta. Druhou částí jsou skupiny Cryptophyta, Pico-biliphyta a Katablepharida, které tvoří parafyletický taxon vzhledem k Archaeplastida, viz Obr. 1.4. Jiná fylogenetická analýza (neobsahující skrytěnky) určila Haptophyta jako sesterské Archaeplastida (BROWN, KOLISKO et al. 2012).

Na rozdíl od skrytěnek, můžeme najít plastid ve všech haptěnkách. Součástí plastidu není stigma. Nejvýraznějším znakem skupiny Haptophyta je, mimo dvou bičíků, hapto-

²Skupina Harosa, někdy označovaná akronymem SAR, se sestává z Heterokontophyta, Alveolata a Rhizaria.

nema – bičíku podobný útvar vyztužený 6–7 mikrotubuly (ANDERSEN 2004). Haptěnký obývají sladké i slané vody a mají značný ekologický význam. Modelovým organismem skupiny Haptophyta je mořská kokoidní řasa s křemičitými (SiO_4) šupinami – *Emiliania huxleyi*, u níž byl osekvenován celý plastidový (SÁNCHEZ PUERTA, BACHVAROFF a DELWICHE 2005), mitochondriální (SÁNCHEZ PUERTA, BACHVAROFF a DELWICHE 2004) i jaderný genom.

Dinophyta – obrněnky

Přibližně polovina druhů obrněnek obsahuje ve svých buňkách plastidy s barvivý. Většina barevných obrněnek má plastid obsahující barvivo peridinin. Sekundární plastid obrněnek je obalen pouze třemi membránami. Mnohé fotosyntetizující obrněnky se vyživují mixotrofně (STOECKER 1999).

Na rozdíl od většiny ostatních barevných organismů, které jsou věrné svým endosymbiontům, chovají se obrněnky k plastidům poněkud promiskuitně. Tato vlastnost může být dána zejména povahou plastidových genomů obrněnek. Většina původní DNA endosymbionta se přemístila do obřího jádra obrněnky (dinokaryonu), zatímco v plastidu zůstávající DNA je uspořádána v malých, často jediný gen obsahujících kruhových molekulách (ZHANG, GREEN a CAVALIER-SMITH 1999; GREEN 2004). Také v jaderném genomu obrněnky *Ceratium horridum*, s plastidem obsahujícím peridinin, jsou plastidové geny uloženy v podobě malých kroužků DNA (LAATSCH, ZAUNER et al. 2004).

Bazální heterotrofní obrněnka *Cryptothecodinium cohnii* pravděpodobně obsahuje rudimentární plastid, neboť v jaderném genomu byly nalezeny N-koncové plastidové signální peptidy (SANCHEZ-PUERTA, LIPPMEIER et al. 2007). K nejbližším příbuzným obrněnek patří heterotrofní parazit mlžů *Perkinsus marinus*, u kterého byly zjištěny N-terminální plastidové signální sekvence podobné obrněnčím (STELTER, EL-SAYED a SEEGER 2007). Zdá se tedy, že u obrněnek došlo ke ztrátám fotosyntetických schopností.

Apicomplexa – výtrusovci

Součástí buňky většiny druhů výtrusovců je rudimentární, třemi až čtyřmi membránami obklopený fotosyntézy neschopný plastid zvaný apikoplast, který s velkou pravděpodobností pochází ze sekundární (nebo vyšší) endosymbiózy (LIM a MCFADDEN 2010). Až do objevení dvou fotosyntetizujících zástupců skupiny Alveolata, *Chromera velia* (MOORE, OBORNÍK et al. 2008) a *Vitrella brassicaformis* (Alveolata: Chromerida) (OBORNÍK, MODRÝ et al. 2012), kteří jsou pravděpodobně nejbližšími známými fotosyntetickými příbuznými výtrusovců, a osekvenování jejich plastidových genomů, nebylo příliš jasné, je-li původ apikoplastu červený nebo zelený. Molekulární data získaná z plastidů skupiny Chromerida upřednostňují červenou endosymbiózu před zelenou (JANOUSKOVEC, HORÁK et al. 2010). Díky ztrátě fotosyntetických funkcí mohl být genom apikoplastu, jakož i počet genů, které přešly z plastidu do jádra, silně zredukován, což ale komplikuje fylogenetické analýzy.

Zdá se, že buňky druhu *Cryptosporidium parvum* (ZHU, KEITHLY a PHILIPPE 2000)

a hromadinky druhu *Gregarina niphandrodes* (TOSO a OMOTO 2007) neobsahují apikoplast žádný.

Ciliophora – nálevníci

Nálevníci jsou velmi početnou skupinou prvoků, kteří žijí buď volně nebo v symbióze s jinými organismy. Dle hypotézy Chromalveolata (CAVALIER-SMITH 1999) byl předek nálevníků obdařený plastidem, což by mohla potvrzovat fylogeneze genu pro glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (FAST, KISSINGER et al. 2001). Je-li tato teorie pravdivá, pak by v dnešních nálevnících, podle současných představ, měly zůstat molekulární stopy po tomto plastidu. Při studování genomu makronukleu nálevníka vejcovky (*Tetrahymena thermophila*), sestávajícího z 27 446 předpovězených genů, bylo zjištěno, že u 16 genů je možno hledat barevný původ a 14 z těchto 16 genů existuje i v genomech ostatních zástupců skupiny Chromalveolata a 11 dokonce v další heterotrofní skupině – Oomycetes (TYLER, TRIPATHY et al. 2006). Je otázkou, jaká část těchto genů přišla do genomu vejcovky horizontálním genovým transferem a jaká intracelulárním genovým transferem (REYES-PRieto, MOUSTAFA a BHATTACHARYA 2008).

1.1.4 Terciární endosymbiózy plastidu

Terciární endosymbióza je proces, při kterém pohltí ektosymbiont endosymbionta, obsahujícího endosymbionta s již pohlceným endosymbiontem. Pohlceným organismem může být tedy kdokoli se sekundárním plastidem, ačkoliv jsou známy jen červené terciární endosymbiózy.

Bylo popsáno několik případů terciární endosymbiózy – všechny u obrněnek (Alveolata: Dinophyta). Například *Karenia* a *Karlodinium* odvozují svůj plastid od haptěnek (Haptophyta) (TENGS, DAHLBERG et al. 2000). Zajímavým případem je *Kryptoperidinium*, které získalo svého barevného endosymbionta – rozsivku (Ochromphyta: Bacillariophyceae) (DODGE a CRAWFORD 1969; INAGAKI, DACKS et al. 2000) – poměrně nedávno, protože tento endosymbiont obsahuje plastid, jádro a dokonce mitochondrii (CHESNICK, KOOISTRA et al. 1997; IMANIAN a KEELING 2007; MCEWAN a KEELING 2004).

1.1.5 Zvláštní případy endosymbióz

U některých nálevníků (LAVAL-PEUTO a FEBVRE 1986) můžeme, podobně jako u některých obrněnek (MINNHAGEN, CARVALHO et al. 2008), některých dírkonošců (Rhizaria: Foraminifera) (BERNHARD a BOWSER 1999) a dokonce některých zadožábých plžů (Opisthobranchia: Sacoglossa) (RUMPHO, WORFUL et al. 2008), najít tzv. kleptoplastidy. Pokud fagotrofní organismus pozře řasu, ze které stráví vše kromě jejího plastidu a tento plastid dokáže po omezenou dobu v těle fagotrofa fungovat, označujeme takovýto plastid termínem kleptoplastid („odcizený plastid“) (MINNHAGEN, CARVALHO et al. 2008). Dokonce i v případě plžů pravděpodobně dochází k transferu genů z plastidu do zárodečné linie buněk ektosymbionta (RUMPHO, WORFUL et al. 2008).

Mořský, červené přílivy (angl. *red tides*, mořská obdoba vodního květu) způsobující druh *Dinophysis acuminata*, který je navíc zodpovědný za DSP (*diarrhetic shellfish poisoning*), má kleptoplastid odvozený od skrytěnek (HACKETT, MARANDA et al. 2003; SCHNEPF a ELBRACHTER 1988). Velmi zajímavý je způsob, jakým tento skrytěnění plastid získává. *Dinophysis* se neživí skrytěnkami, ale nálevníkem druhu *Mesodinium rubrum* (syn. *Mirionecta rubra*), který vyhledává a požírá skrytěnky rodu *Teleaulax*. Obrněnka následně stráví nálevníka a skrytěnku, kromě jejího plastidu (KIM a ARCHIBALD 2010; WISECAVER a HACKETT 2010).

Prazvláštní životní cyklus má *Hatena arenicola* (Hacrobia: Katablepharida), jejíž buňky obsahují endosymbionta – řasu rodu *Nephroselmis* (Prasinophyceae: Pseudoscurfieldiales: Pycnococcaceae). Tento endosymbiont má zvětšený plastid, zatímco ostatní buněčné struktury jsou degradovány. Při binárním dělení získá endosymbionta pouze jedna z dceřiných buněk. Druhá si musí svého budoucího endosymbionta ulovit sama (OKAMOTO a INOUE 2006).

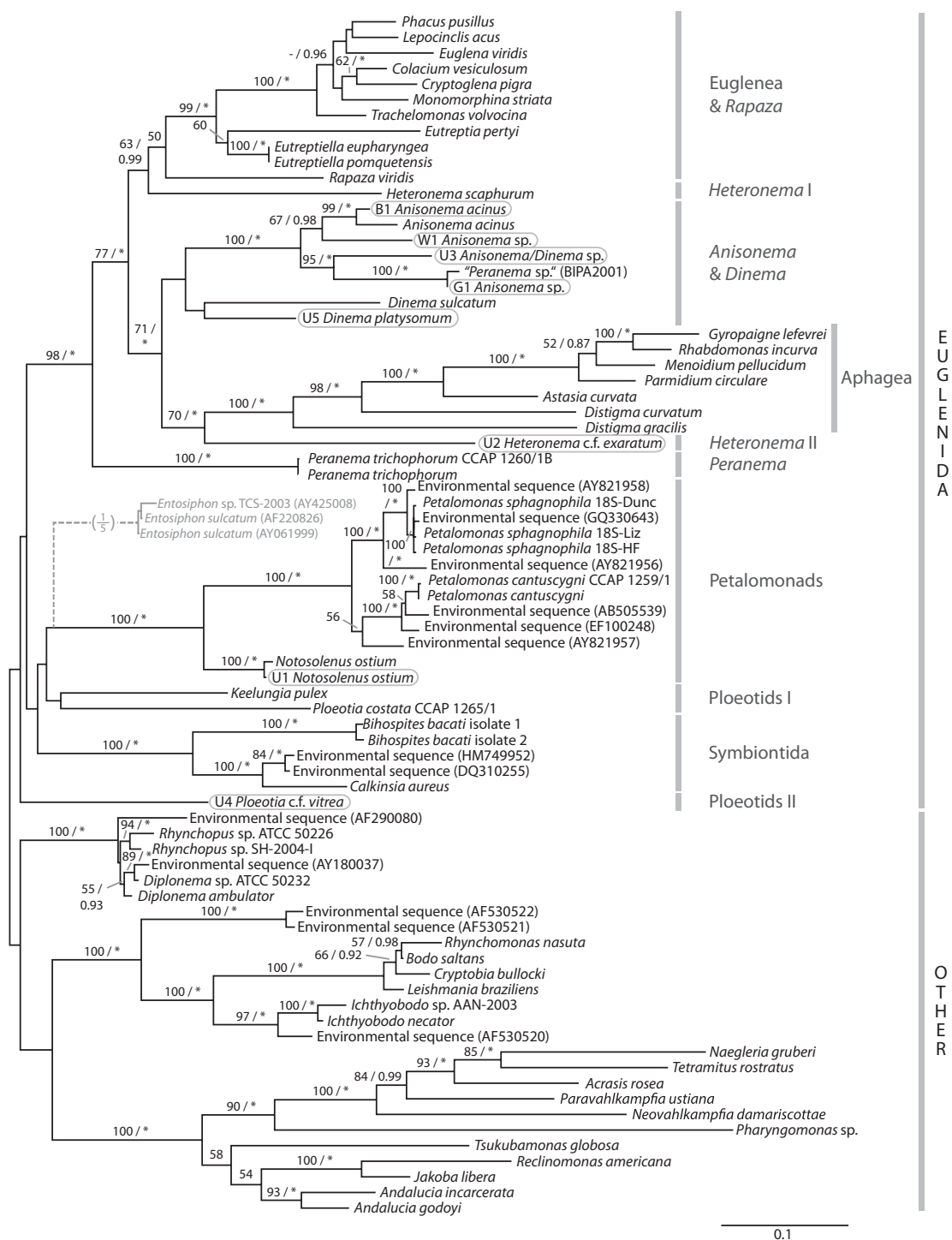
Je známa nejméně jedna endosymbióza, ve které v roli endosymbionta i ektosymbionta vystupují bakterie. Součástí těla vlnatek (Sternorrhyncha: Coccoidea: Pseudococcidae) jsou specializované orgány, mycetomy, které obsahují primární bakteriální endosymbionty ze skupiny Betaproteobacteria. Cytoplasma primárních endosymbiontů je plná sekundárních endosymbiontů – bakterií ze skupiny Gammaproteobacteria (DÖHLEN, KOHLER et al. 2001; THAO, GULLAN a BAUMANN 2002).

1.2 Kmen Euglenozoa

Kmen Euglenozoa se dnes sestává ze dvou druhově bohatých a intenzivně zkoumaných skupin – Kinetoplastea (bičivky) a Euglenoidea (krásnoočka) a dvou skupin na druhy chudých a velmi málo zkoumaných – Diplonemea a Symbiontida (YUBUKI, EDGCOMB et al. 2009).

V roce 1976 (PRESTON 1976) byla poprvé naznačena možnost blízké příbuznosti krásnooček a bičivek na základě čtyř sdílených morfologických znaků – diskovitých mitochondriálních krist, bičíkové kapsy (*flagellar pocket*), paraxonemální tyče a pelikuly s korzetem mikrotubulů, které podpírají většinu buněčného povrchu. V roce 1978 (SCHWARTZ a DAYHOFF 1978) byla tato příbuznost potvrzena molekulárně – na základě fylogeneze genu pro cytochrom *c*. Cavalier-Smith (CAVALIER-SMITH 1981) pak navrhl pro taxon zahrnující Kinetoplastea a Euglenoidea název Euglenozoa. Po přidání Symbiontida a Diplonemea mezi Euglenozoa byly nalezeny „nové“ synapomorfie Euglenozoa – tři asymetricky uspořádané mikrotubulární kořeny asociované s bazálními tělísky bičíků, heteromorfní paraxonemální tyče a tubulární extrusomy (YUBUKI, EDGCOMB et al. 2009; BRUGEROLLE 1985).

Zástupci kmene Euglenozoa se od ostatních eukaryot liší v mnoha ohledech, viz dále. Cytoplasmatická mRNA zástupců kmene Euglenozoa je obvykle dotvářena mechanismem *trans-splicing* (FRANTZ, EBEL et al. 2000; MUCHHAL a SCHWARTZBACH



Obrázek 1.5: Fylogenetický strom krásnooček. Převzato z LAX a SIMPSON 2013.

1992; SUTTON a BOOTHROYD 1986; STURM, MASLOV et al. 2001), který přidává několik nukleotidů dlouhé sekvence SL (*splice leader*), která je specifická pro určitý taxon. SL se přidává na začátek (na 5' konec) mRNA. Nedílnou součástí genomu bičivek, ale přinejmenším také některých krásnooček, je přítomnost báze J (β -D-glucosyl-hydroxymethyluracil) v genomu (DOOIJES, CHAVES et al. 2000).

Vnitřní uspořádání kmene Euglenozoa zatím není zcela uspokojivě objasněno, neboť jeho hledání je komplikováno jednak velmi odlišnými („divergentními“) evolučními rychlostmi genů pro 18S rRNA jednotlivých skupin a jednak mutačním nasycením 18S rDNA (MOREIRA, LOPEZ-GARCIA a RODRIGUEZ-VALERA 2001). Pro vzájemné postavení Kinetoplastea, Diplonemea a Euglenoidea, tj. před popsáním třídy Symbiontida, byly navrženy všechny tři možné topologie fylogenetických vztahů. Na základě morfologických znaků se jevily nejpravděpodobnějšími sesterskými taxony Diplonemea a Euglenoidea (CAVALIER-SMITH 1995; KIVIC a WALNE 1984; LARSEN a PATTERSON 1990) nebo Diplonemea jako sesterská skupina krásnooček a bičivek (MONTEGUT-FELKNER a TRIEMER 1994). Naopak většina molekulárních dat podporuje blízkou příbuznost Diplonemea a Kinetoplastea (MASLOV, YASUHIRA a SIMPSON 1999; STURM, MASLOV et al. 2001; SIMPSON a ROGER 2004). Několik unikátních molekulárních znaků (kodón TGA je transkribován na aminokyselinu tryptofan (INAGAKI, HAYASHI-ISHIMARU et al. 1997; MASLOV, YASUHIRA a SIMPSON 1999; YASUHIRA a SIMPSON 1997), RNA editace (FLEGONTOV, GRAY et al. 2011; KIETHEGA, TURCOTTE a BURGER 2011; MARANDE a BURGER 2007; MASLOV, YASUHIRA a SIMPSON 1999; SIMPSON, GILL et al. 2004)), které sdílejí Diplonemea a Kinetoplastea, ukazuje Euglenoidea jako bazální taxon Euglenozoa.

Existence sexuálního rozmnožování u krásnooček je stále zakryta rouškou tajemství. V minulém století bylo nejméně třikrát pozorováno splývání 2 bičíkovců druhu *Scytomonas pusilla* (syn. *Copromonas subtilis*) s následným, pravděpodobně meiotickým dělením (DOBELL 1908; MIGNOT 1962; WAYLAND 1964). Ve všech případech šlo o syngamii (gametogamii; splývání samotných gamet).

V případě bičivek byly náznaky sexuálního rozmnožování pozorovány u *Trypanosoma cruzi* (GAUNT, YEO et al. 2003), *Dimastigella trypaniformis* (VICKERMAN 1991), *Leishmania* (VOLF a SADLOVA 2009) a *Trypanosoma brucei* (GIBSON, PEACOCK et al. 2006).

1.2.1 Třída Symbiontida

Skupina Symbiontida, sestávající se ze tří monotypických rodů – *Postgaardi* (YUBUKI, SIMPSON a LEANDER 2012), *Calkinsia* (YUBUKI, EDGCOMB et al. 2009) a *Bihospites* (BREGLIA, YUBUKI et al. 2010), byla vytvořena poměrně nedávno (YUBUKI, EDGCOMB et al. 2009), a proto nebyla zahrnuta v úvahách výše o vztazích hlavních skupin Euglenozoa. U rodu *Postgaardi* není zcela jasné, zda-li opravdu patří mezi Symbiontida – chybí totiž jakákoliv molekulární data. Existují však environmentální sekvence, které velice dobře zapadají mezi Symbiontida. Je možné, že patří právě rodu *Postgaardi* (YUBUKI, SIMPSON a LEANDER 2012). Symbiontida žijí v anoxických prostředích. Všichni

se pravděpodobně živí fagocytózou. Ke společným znakům zástupců skupiny Symbiontida patří přítomnost epibiotických bakterií a umístění z mitochondrií odvozených organel těsně pod povrchem buňky (YUBUKI, SIMPSON a LEANDER 2012). Stejně jako krásnoočka a na rozdíl od většiny bičivek a zástupců Diplonemea mají příslušníci třídy Symbiontida relativně dlouhá bazální tělíska (YUBUKI, SIMPSON a LEANDER 2012). Je také možné, že Symbiontida jsou vnitřní skupinou Euglenoidea (LAX a SIMPSON 2013), viz Obr. 1.5.

1.2.2 Třída Kinetoplastea – bičivky

K pro člověka nejvýznamnějším organismům vůbec patří bičivky (Kinetoplastea), k nimž se řadí zejména ničivky (*Leishmania*) a trypanosomy (*Trypanosoma*) (ROBERTS a JANOVY 2008). Ničivky způsobují vážná a relativně hodně rozšířená onemocnění, zvaná leishmaniózy, nejen u lidí, ale také psů a dalších zvířat; využívají ke svému přenosu dvoukřídlých vektorů (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) rodu *Phlebotomus* v Evropě, Asii a Africe a rodu *Lutzomyia* v Severní a Jižní Americe (ROBERTS a JANOVY 2008). Trypanosomy žijící na africkém kontinentě, vyvolávající u lidí spavou nemoc, jsou biologicky přenášeny krevsajícími bodavkami rodu *Glossina* (Diptera: Hippoboscoidea: Glossinidae), stejně jako trypanosomy způsobující onemocnění dobytka zvané nagana. Některé trypanosomy se dokázaly z podruží bodavek osvobodit, a tak se rozšířit mimo část Afriky obývanou bodavkami, a jsou nyní mechanicky přenášeny ovády (Diptera: Tabanoidea: Tabanidae), nebo dokonce jen sexuálním stykem savčích hostitelů – koní (ROBERTS a JANOVY 2008). Na druhé straně Atlantiku působí *Trypanosoma cruzi*³ jako původce Chagasovy choroby. Vektory *Trypanosoma cruzi* však nejsou dvoukřídlí, nýbrž zákeřnice (Hemiptera: Reduviidae: Triatominae), a přenos *T. cruzi* je kontaminativní. (ROBERTS a JANOVY 2008).

Bičivky⁴ (Kinetoplastea) jsou monofyletickou skupinou (DESCHAMPS, LARA et al. 2011) zahrnující stovky druhů ve třech desítkách rodů. K charakteristickým (unikátním) znakům (synapomorfíím) bičivek patří přítomnost kinetoplastu – v optickém mikroskopu velice výrazné mitochondriální DNA, složené z netriviálně uspořádaných mikroužků a maxikroužků. Kinetoplast je tvořen nejen mitochondriální DNA, ale také proteiny, které slouží k její replikaci a udržení struktury mtDNA (SIMPSON, LUKES a ROGER 2002). Při buněčném dělení se nejdříve dělí kinetoplast (spolu s cytoskeletem) a až následně jádro. Přítomnost glykosomu, speciálního peroxisomu, ve kterém probíhá část glykolýzy, je mezi živými organismy také téměř jedinečná (HANNAERT a MICHELS 1994), viz dále. Někteří parazitictí zástupci se vyznačují polymorfií – v různých částech životního cyklu zaujímají odlišná morfologická stádia, která jsou určena vzájemnou polohou jádra a kinetoplastu (ROBERTS a JANOVY 2008). Zajímavou molekulární vlast-

³*Trypanosoma cruzi* patří do podrodu *Schizotrypanum* a je jediným jeho zástupcem parazitujícím jiné savce než netopýry (Chiroptera) (LIMA, SILVA et al. 2012).

⁴Třída Kinetoplastea Cavalier-Smith 1981 je obsahově totožná s řádem Kinetoplastida Honigberg 1963 (MOREIRA, LÓPEZ-GARCÍA a VICKERMAN 2004).

ností bičivek, jejíž obdobu najdeme ještě např. u některých obrněnek (LIN, ZHANG et al. 2002), je editace mitochondriální RNA – vkládání uracilů podle vzorů z minikroužků (BLOM, DE HAAN et al. 1998).

Třidu Kinetoplastea dělíme na dvě podtřídy. Bazální Prokinetoplastina s jediným řádem Prokinetoplastida obsahují rody *Ichthyobodo* (rybí ektoparazit) a *Perkinsella*⁵ (měňavčí endosymbiont) (MOREIRA, LÓPEZ-GARCÍA a VICKERMAN 2004). Do druhé podtřídy Metakinetoplastina patří čtyři řády – Eubodonida (*Bodo*), Parabodonida (*Parabodo*, *Cryptobia*, *Procryptobia*, *Cephalothamnium* (volně žijící *C. cyclopum* je koloniálním bičíkovcem (HITCHEN 1974)) a *Trypanoplasma*), Neobodonida (*Actuariola*, *Neobodo*, *Rhynchobodo*, *Rhynchomonas*, *Dimastigella* a *Cruzella*) a Trypanosomatida (*Leptomonas*, *Herpetomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Rhynchoidomonas*, *Phytomonas*, *Leishmania*, *Sauroleishmania*, *Endotrypanum*, *Wallaceina* a *Trypanosoma*). Jako „vyšší“ Kinetoplastida, mj. jednobičíkatá, tradičně označujeme zástupce řádu Trypanosomatida, všechny ostatní pak jako „nižší“, mj. dvoubičíkatá, Kinetoplastida (MOREIRA, LÓPEZ-GARCÍA a VICKERMAN 2004; SIMPSON, STEVENS a LUKES 2006).

1.2.3 Třída Diplonemea

Rody *Diplonema* (syn. *Isonema* (TRIEMER a OTT 1990)) a *Rhynchopus* s několika málo popsánými druhy tvoří třídu Diplonemea. Na základě sekvencí 18S rRNA získaných z hlubokomořských oblastí se zdá, že existuje velké množství organismů patřících do této třídy (LARA, MOREIRA et al. 2009). Obdobně jako některá krásnoočka i Diplonemea vykazují typický způsob pohybu – metabolii, ale na rozdíl od nich postrádají pelikulu a diskoidální krysty mitochondrií. Protože ani *Rhynchopus* ani *Diplonema* nemají paraxonemální tyč, nebylo dlouho zřejmé, že patří do kmene Euglenozoa⁶.

Diplonema byla s určitostí zařazena mezi Euglenozoa na základě fylogeneze genů 18S rRNA a Cox I (MASLOV, YASUHIRA a SIMPSON 1999). *Rhynchopus* na základě fylogeneze genu 18S rRNA (CAVALIER-SMITH 2000). Později byla také potvrzena blízká příbuznost obou rodů (BUSSE a PREISFELD 2002).

Do rodu *Diplonema* patří volně žijící prvoci se dvěma krátkými, stejně dlouhými bičíky (TRIEMER a OTT 1990). Vyživují se fagotrofně a obývají vody sladké i mořské. Lze je kultivovat axenicky (MAKIUCHI, ANNOURA et al. 2011), přesto, že se živí bakteriemi (TRIEMER a OTT 1990). U druhu *Diplonema papillatum* byla nalezena aldoláza pracující uvnitř organely; tato aldoláza obsahuje také peroxisomální signál typu 2, který je velmi podobný signálu u bičivek; z těchto dvou faktů plyne možnost existence glykosomů u Diplonemea (MAKIUCHI, ANNOURA et al. 2011).

⁵Dříve *Perkinsiella*. Rod byl přejmenován, protože rodové jméno *Perkinsiella* bylo dříve užito k popisu svítilky (Auchenorrhyncha: Fulgoromorpha) čeledi ostruhovnickovitých (Delphacidae) (KIRKALDY 1903; DYKOVÁ, FIALA a PECKOVÁ 2008).

⁶Ač *Rhynchopus amitus* byl v roce 1948 popsán jako neobvyklé krásnoočko (Euglenoidea) (SKUJA 1948) a *Diplonema breviciliata* byla při svém objevení v roce 1913 zařazena do čeledi Astasiidae, čili mezi krásnoočka.

Zástupci rodu *Rhynchopus* s bičíky tak krátkými, že nevystupují z paraflagelární kapsy (SCHNEPF 1994), jsou jak volně žijící⁷, tak endobiotičtí. Obsadili niky jako jsou žábry humra druhu *Nephrops norvegicus*, kde lze nalézt hned dva druhy rodu *Rhynchopus*. Jeden z nich dokáže za určitých stresových situací opustit žábry a proniknout do krve hostitele. K těmto stresovým situacím patří pravděpodobně také napadení humra parazitickou obrněnkou rodu *Hematodinium* (VON DER HEYDEN, CHAO et al. 2004).

Ultrastruktura ne nepodobná zástupcům třídy Diplonemea byla objevena také u organismu obývajícího žábry kraba druhu *Cancer irroratus* (BODAMMER a SAWYER 1981) a hemocoel larev mlžů druhu *Panopea abrupta*⁸ (KENT, ELSTON et al. 1987).

1.2.4 Třída Euglenoidea – krásnoočka

Třída Euglenoidea (syn. Euglenida, Euglenophyceae, Euglenophyta) zahrnuje zelené fototrofní bičíkovce i jejich heterotrofní bezbarvé příbuzné. Všechna krásnoočka mají pelikulu, která je tvořena čtyřmi hlavními komponentami – plasmatickou membránou, podpůrnými proteinovými proužky, které běží podél celé buňky, subpelikulárními mikrotubuly a tubulárními cisternami endoplasmatického retikula, viz Obrázek 4.3 (LEANDER a FARMER 2000). Na rozdíl od většiny ostatních eukaryot mají krásnoočka permanentně kondenzované chromosomy (TRIEMER a FARMER 1991a; TRIEMER a FARMER 1991b).

Krásnoočka jsou různorodou skupinou jednotlivě žijících bičíkovců, kteří se aktivně pohybují nebo přechodně tvoří palmelová stádia (klidová stádia obalená slizem). Jednou z výjimek jsou zástupci rodu *Colacium*, kteří žijí epifyticky (epizoicky) na sladkovodních korýších a volně se pohybují jen příležitostně (LEEDALE 1967). Zásobním polysacharidem všech krásnooček je paramylon (β -1,3-glukan), který vytváří v buňce krystaly, jejichž tvar, velikost a počet je specifický pro daný taxon (LEEDALE 1967). Na rozdíl od autotrofních organismů vyžadují všechna krásnoočka (i fototrofní) organickou výživu a vitamíny B₁ a B₁₂.

Některé druhy krásnooček produkují toxin zvaný euglenophycin, který působí negativně na ryby, rostliny, sinice a rakovinu (ZIMBA, MOELLER et al. 2010). Euglenophycin je alkaloid strukturně velmi podobný jedu jihoamerických „ohnových“ mravenců (*Solenopsis saevissima*) (ZIMBA, MOELLER et al. 2010; MACCONNELL, BLUM a FALES 1970).

Dle způsobu výživy můžeme krásnoočka dělit na fototrofní, osmotrofní a fagotrofní. Fototrofní druhy tvoří, podobně jako druhy osmotrofní, monofyletickou linii, která se pravděpodobně vyvinula z fagotrofních předků.

1.2.4.1 Fagotrofní krásnoočka

Fagotrofie je považována za nejranější způsob obživy krásnooček nejen na základě molekulárních, ale také morfologických dat (LEANDER 2004; LEANDER a FARMER 2001).

⁷Druh *Rhynchopus coscinodiscivorus* vysává cytoplasmu planktonních centrických rozsivek druhu *Coscinodiscus concinnus* (SCHNEPF 1994).

⁸Tento mlž již bohužel vyhynul. Jeho jméno je často (KENT, ELSTON et al. 1987) uváděno jako *Panope abrupta* (GROYE 1907).

Z fagotrofních krásnooček se vyvinula fototrofní i osmotrofní krásnoočka, která postupně schopnost fagotrofie ztratila. Fagotrofní krásnoočka můžeme rozdělit na bakteriovorní a eukaryovorní dle typu potravy, kterou konzumují.

Fagotrofní krásnoočka byla na základě morfologie a cytologie dělena do dvou řádů – Sphenomonadales a Heteronematales (LEEDALE 1967). V současnosti se ukazuje, že fagotrofové tvoří několik monofyletických linií, které těmto řádům neodpovídají. Např. *Petalomonas cantuscygni* a rody *Notosolenus* a *Ploeotia* tvoří pravděpodobně bazální taxon celé třídy Euglenoidea, zatímco *Peranema trichophorum* je nejspíše sesterská fototrofní nebo osmotrofní krásnoočka (PREISFELD, BUSSE et al. 2001; BUSSE a PREISFELD 2003a; LAX a SIMPSON 2013).

Buňky relativně vzácného krásnoočka druhu *Petalomonas sphagnophila*, obývající rašeliníky (Bryophyta: Sphagnales: *Sphagnum*) a jejich blízká okolí, obsahují kulovitá barevná tělíska, která přetrvávají v cytoplasmě až několik týdnů, dělí se a jsou obalena dvěma membránami. První bližší výzkum elektronovým mikroskopem ukázal na podobnost těchto tělísek se sinicemi rodu *Synechocystis* (SCHNEPF, SCHLEGEL a HEPERLE 2002). Spektrální analýza a molekulární metody však náš pohled na podobnost se sinicemi změnily. Ukázalo se, že absorpční spektrum kulovitých tělísek neodpovídá žádné známé biologické podstatě, tj. není známa žádná odpovídající biologická struktura. Kromě tohoto barevného endosymbionta bylo v buňkách *P. sphagnophila* nalezeno pět dalších bakteriálních endosymbiontů patřících mezi Rickettsiales, Gammaproteobacteria, Deltaproteobacteria a Firmicutes (KIM, PARK et al. 2010).

1.2.4.2 Fototrofní krásnoočka

Monofyletický taxon Euglenophycidae, jehož bazální větev tvoří *Rapaza*, zahrnuje také řády Euglenales a Eutreptiales (LEEDALE 1967), viz Obr. 1.5 (YAMAGUCHI, YUBUKI a LEANDER 2012). Naprostá většina příslušníků Euglenophycidae je fototrofní. Existují však i sekundárně osmotrofní druhy, např. *Euglena longa* či *E. quartana*.

Jedním z výrazných znaků všech fototrofních krásnooček je krásně červené stigma (odtud pochází české pojmenování krásnoočko), které je uloženo přímo v cytoplasmě a nikoliv v plastidu, tak jako je tomu u většiny ostatních řas obdařených stigmatem. Spolu se zvláštním zduřením báze bičíku v paraflagelární kapse vytváří světločivný aparát. Ten zůstává zachován i u sekundárně bezbarvých krásnooček.

Nejbližším příbuzným plastidu krásnooček, který je ohraničen třemi membránami, je pravděpodobně zelená řasa rodu *Pyramimonas* (Chlorophyta: Prasinophyceae: Pyramimonadales) (TURMEL, GAGNON et al. 2009).

Rapaza viridis je jedním z organismů, který může hrdě nosit označení přechodný člen. *Rapaza* je totiž eukaryovorní a zároveň fotosyntetická. Proto byl způsob její výživy nazván mixotrofním. *Rapaza* vyžaduje světlo i eukaryotickou kořist – nedokáže přežít ve tmě, ale ani bez své kořisti. Kořistí *R. viridis* je výhradně jedna linie zelené řasy rodu *Tetraselmis* (Chlorodendrophyceae: Volvocales: Chlamydomonadaceae – (MARIN a MELKONIAN 2010)) (YAMAGUCHI, YUBUKI a LEANDER 2012). Dobře živěné buňky

krásnoočka *R. viridis* mají dva typy plastidů – trvalý, příbuzný plastidům ostatních krásnooček a dočasný (kleptoplastid) ze své potravy.

Do řádu Eutreptiales patří dva, převážně mořské, rody – *Eutreptia* a *Eutreptiella* (syn. *Tetreutreptia*). Vyznačují se zelenými nebo bezbarvými buňkami. Mají dva viditelné heterodynamické bičíky a schopnost metabolie. Metabolie (angl. *metaboly*, *euglenoid movement*) je způsob pohybu, který je typický pro krásnoočka, spočívající v tvaroměně buňky.

Řád Euglenales patří mezi druhově nejpočetnější skupiny krásnooček. Zahrnuje na deset rodů a stovky druhů. Žijí převážně ve sladkých vodách a mají jen jeden bičík vycházející z periflagelární kapsy. Rody *Trachelomonas* a *Strombomonas* si vytvářejí polysacharidové slizovité loriky, téměř úplně buňku obklopující, s apikálním otvorem, kterým vychází bičík. Někteří zástupci jsou sekundárně osmotrofní (např. *Euglena longa*), jiné lze (alespoň částečně) o plastid připravit (angl. *bleeching*), např. antibiotiky (MIYOSHI a TSUBO 1969; ZAHALSKY, HUTNER et al. 1962). Nedávno byla v rámci řádu vyčleněna čeleď *Phacaceae*, která zahrnuje rody *Phacus*, *Lepocinclis* a *Discoplastis* (KIM, SHIN a TRIEMER 2010). Ostatní zástupci patří do čeledi *Euglenaceae*.

1.2.4.3 Osmotrofní krásnoočka

Mezi primárně osmotrofní krásnoočka patří zástupci řádu Rhabdomonadales (syn. Rhabdomonadida) (LEEDALE 1967) a rodů *Distigma* a *Astasia*⁹. Na rozdíl od ostatních krásnooček postrádají osmotrofní krásnoočka dobré diferenciační znaky jako plastidy či cytofarynx.

Do řádu Rhabdomonadales je řazeno pět rodů – *Rhabdomonas*, *Menoidium*, *Rhabdospira*, *Gyropaigne* a *Parmidium*. Vyznačují se přítomností jediného viditelného bičíku a rigidními buňkami, tj. nevykazují metabolii.

Na rozdíl od zástupců řádu Rhabdomonadales mají zástupci rodů *Distigma* a *Astasia* schopnost metabolie. Zástupci rodu *Distigma* mají navíc dva heterodynamické bičíky (BUSSE a PREISFELD 2003b). Pro všechna primárně osmotrofní krásnoočka byl navržen taxon Aphagea (BUSSE a PREISFELD 2003b), který už před tím použil Cavalier-Smith (CAVALIER-SMITH 1993) pro všechna fototrofní a osmotrofní krásnoočka, tento taxon je tedy pravděpodobně polyfyletický.

U některých krásnooček byly pozorovány endonukleární bakterie (LEEDALE 1969), k těmto krásnoočkům patří i *Rhabdomonas costata* (LEEDALE a HIBBERD 1974). *Distigma proteus* má bakterie v cytoplasmě (ANGELER, MÜLLNER a SCHAGERL 1999; YAMAGUCHI a ANDERSON 1994).

1.2.4.4 Endobiotická krásnoočka

Nejméně prozkoumanou skupinou krásnooček jsou jednoznačně krásnoočka žijící v obratlovcích; jsou řazena do řádu Euglenamorphales (LEEDALE 1967).

⁹S výjimkou druhu *Astasia longa*, který byl přeargován do rodu *Euglena* (BUSSE a PREISFELD 2003b).

Euglenamorpha hegneri obývá rektum pulců rodu *Rana* (Anura: Ranoidea: Ranidae) (WENRICH 1924). Byla nalezena pouze dvakrát v USA a jednou v Bangladéši. Vytváří dvě formy – zelenou s chloroplasty a 3 bičíky a bezbarvou se 6 bičíky. Jen bezbarvá forma se dokáže množit.

Hegneria leptodactyli byla nalezena pouze jednou v rektu pulců rodu *Leptodactylus* (Anura: Hyloidea: Leptodactylidae) v okolí Mexico City. Je bezbarvá a má 7 bičíků (BRUMPT a LAVIER 1924). Je možné, že jde o bezbarvou formu *E. hegneri*.

K ani jednomu ze dvou existujících druhů endobiotických krásnooček bohužel neexistují žádná molekulární ani ultrastrukturální data. Jejich zařazení mezi krásnoočka je tedy založeno pouze na morfologických pozorováních ve světelném mikroskopu. Znalost jejich přesné fylogenetické pozice by mohla napomoci k objasnění historie plastidů u krásnooček.

Cíle

- Pomocí elektronové mikroskopie ověřit, zda v buňce krásnoočka druhu *Rhabdomonas costata* není přítomen plastid nebo jeho rudiment.
- Osekvenovat transkriptom *R. costata*.
- Vyhledat v transkriptomu geny, které by mohly pocházet z předka krásnoočího plastidu. V transkriptomu *R. costata* by přítomnost takových genů vyloučila nulovou hypotézu, kterou je neexistence zeleného plastidu u společného předka *R. costata* a zelených krásnooček.

3.1 Kultivace krásnoočka *Rhabdomonas costata*

Kmen PANT2 pochází z brazilského Pantanal. V naší laboratoři je držen cca 4 roky v kultivačním médiu ATCC 802 (Cerofyl) o $\text{pH} = 7,4$. 1 ml kultury byl očkovan do 10 ml čistého média v intervalu 2–4 týdny. Jana Szabová vytvořila tři klonální linie kmene PANT2. Axenizační pokusy, založené na přidávání antibiotik a migračních experimentech v S a U trubicích nebyly úspěšné.

Při přípravě média rozpustíme 2,5 g cerofylu (Scholar[®] Chemistry) v 1 dm³ destilované vody a vaříme 5 min v Ehlermayerově baňce. Přefiltrujeme přes složený filtrační papír a přidáme Na₂HPO₄ ($m = 0,5$ g). Na vyrovnání množství vypařené vody a ztrát při filtraci doplníme destilovanou vodou na celkový objem 1 dm³. Sterilizujeme v autoklávu Falcon 30 přibližně půl hodiny při teplotě 121 °C.

3.2 Světelná a elektronová mikroskopie

Při přípravě preparátu pro světelnou mikroskopii jsme nabrali velmi malou kapku ze dna kultivační nádoby a umístili ji na podložní sklíčko. Ihned po zakrytí krycím sklíčkem jsme vzorek prohlíželi v optickém mikroskopu Olympus BX51 vybaveného kamerou Olympus DP70 při nastavení Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu.

Preparáty pro skenovací elektronovou mikroskopii byly připravovány standardním způsobem. Dobře narostlá kultura byla centrifugována při přetížení 13 200 g po 10 min při teplotě 12 °C. Po odstranění supernatantu byly zahuštěné buňky naneseny na malý kousek filtračního papíru. Filtrační papír byl poté vložen do mikrozkušavky s 2,5% glutaraldehydem a 0,1 M kakodylátovým pufrem. Po 24 h trvající inkubaci při teplotě 8 °C byly preparáty předány do laboratoře elektronové mikroskopie na další zpracování. Na rastrovacím elektronovém mikroskopu JEOL JSM-6380LV bylo nafoceno na 30 snímků kmene PANT2.

Preparáty pro transmisní elektronovou mikroskopii byly připravovány standardním způsobem. Dobře narostlá kultura byla centrifugována při přetížení 13 200 g po 10 min

při teplotě 12 °C. Po odstranění supernatantu zůstaly zahuštěné buňky v objemu 1 ml, který byl přemístěn do mikrozkušavky (eppendorfký) a zalit 1 % roztokem agarózy. Obsah mikrozkušavky byl fixován 2,5% glutaraldehydem s 0,1 M kakodylátovým pufrům a inkubován 24 h při teplotě 8 °C. Takto připravené preparáty byly předány do laboratoře elektronové mikroskopie na další zpracování. Na transmisním elektronovém mikroskopu JEOL JEM-1011 s CCD kamerou Veleta a akvizitním softwarem Olympus Soft Imaging Solution GmbH bylo vyfotografováno na 200 snímků zachycujících ultrastrukturu krásnoočka *Rhabdomonas costata*.

3.3 Izolace RNA

Pro izolaci RNA byl kmen PANT2, klon 3, chován v 50ml umělohmotných zkumavkách. Buňky byly počítány v počítací komůrce. Čtyři dobře narostlé kultury o celkovém objemu 200 ml a celkovém počtu 4 300 000 buněk byly centrifugovány s přetížéním 12 000 g po dobu 15 min za pokojové teploty. Supernatant byl slit a dále bylo při izolaci RNA pokračováno dle upraveného protokolu, který je uveden níže. K samotné izolaci celkové RNA byl použit TRI Reagent[®] RNA Isolation Reagent (CHOMCZYNSKI a SACCHI 2006) firmy Applied Biosystems a Ambion.

1. Buněčný sediment rozsuspendovat v Trizolu (TRI reagent) v množství odpovídající 900 µl trizolu na 10⁶ buněk.
2. Inkubovat 5 min při pokojové teplotě (25 °C).
3. Převést do 1,5 ml eppendorfek.
4. Přidat 200 µl chloroformu.
5. 15 s vortexovat.
6. Inkubovat 2 min při pokojové teplotě.
7. Stočit 15 min, 13 200 min⁻¹ (maximum falkonove centrifugy), 4 °C. Vydělí se vrstvy RNA, proteinů a DNA.
8. Horní vrstvu (RNA) přenést do nové zkumavky (nenabrat proteiny!).
9. Přidat 500 µl isopropanolu.
10. 15 s vortex.
11. 10 min inkubovat při pokojové teplotě.
12. Stočit na 13 200 min⁻¹, 10 min při 4 °C.
13. Odebrat (vylít) supernatant (měl by být vidět sediment).
14. Přidat 1 ml předchlazeného 75 % ethanolu.
15. Stočit na 13 200 min⁻¹, 10 min, 4 °C.
16. Vylít supernatant, zbytek ethanolu odsát. Pelet vysušit při pokojové teplotě (zprůhlednění okrajů), ale nepřesušit!
17. Pelet rozpustit v 30 µl PCR vody.
18. Inkubovat 10 min při 60 °C.

19. Koncentraci změřit na nanodropu – pozor jedná se o směs bakteriální a eukaryotické totální RNA.
20. Skladovat v -80°C .

Na spektrofotometru Nanodrop ND-1000 byla změřena koncentrace izolované RNA $500\text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, které odpovídá celkovému množství $15\text{ }\mu\text{g}$. RNA byla izolována celkem čtyřikrát, ale pouze výsledek posledního, zde uvedeného pokusu byl sekvenován.

3.4 Sekvenace celkové RNA

Získaná RNA byla sekvenována metodou 454 v laboratoři Čestmíra Vlčka na Oddělení genomiky a bioinformatiky Ústavu molekulární genetiky AV ČR, v. v. i. Při sekvenování vzorku RNA bylo získáno 349 918 čtení (*reads*) 174 323 866 bází, tj. průměrná délka jednoho sekvenovaného řetězce byla 498 bází.

Pro dosaženou kvalitu vyjádřenou hodnotou Q_{40}^{+} (*quality score 40*) platí

$$Q_{40}^{+} = 96,39\%, \quad (3.1)$$

kde pro Q_k a pravděpodobnost chyby E platí

$$k = -10 \log_{10} E, \quad (3.2)$$

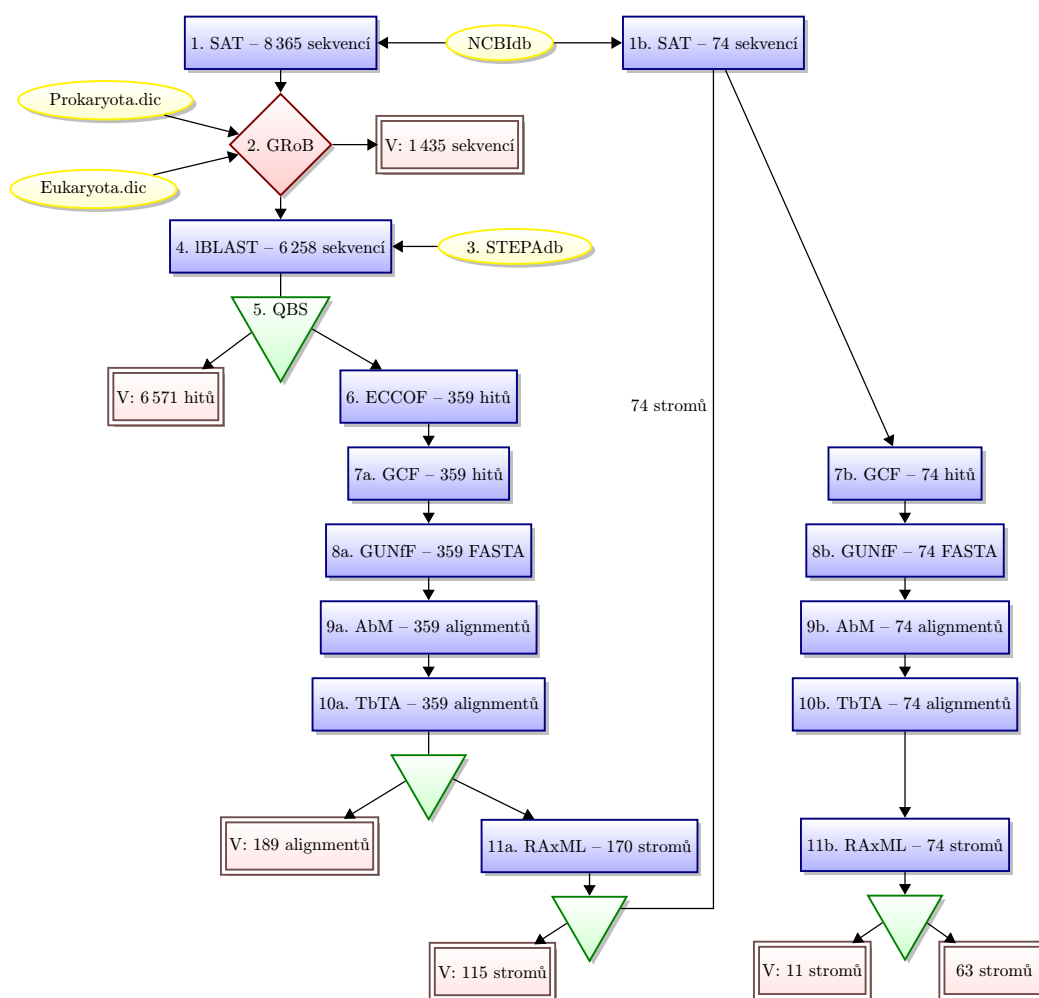
tj. hodnota Q_{40}^{+} vyjadřuje relativní podíl bází, u nichž je pravděpodobnost nesprávného přechtení $\frac{1}{10\,000}$. Takové báze se zapisují velkým písmenem. Relativní podíl bází u nichž je pravděpodobnost správného čtení nižší než výše uvedená hodnota, je označován Q_{39}^{-} a tyto báze jsou pak ve výstupu zapsány malým písmenem (LOMAN, MISRA et al. 2012).

Sekvence, která významově přibližně odpovídá exonům, se v terminologii 454 pyrosekvenování nazývá *contig* (z anglického *contiguous*). Těchto „exonů“ bylo po poskládání sekvencí 8 365. Sekvence, která přibližně odpovídá již sestříhaným mRNA, se v terminologii 454 pyrosekvenování nazývá *isotig*. Každý *isotig* je poskládán z jednoho až několika „exonů“. Metoda získávání sekvencí typu *isotig* se anglicky nazývá *assembly*. *Assembly* bylo provedeno v laboratoři Čestmíra Vlčka programem Newbler v2.6. Sekvencí typu *isotig* bylo získáno 6 930. Průměrná délka získaných „exonů“ byla 927 bází.

3.5 *In silico* zpracování sekvenčních dat

Všechny skripty byly napsány v programovacím jazyce Python 2.7. Skript je spustitelný textový soubor napsaný ve skriptovacím jazyce, jako jsou např. Python, BASH, či Perl. Veškeré výpočty běžely na počítačích s platformou Windows 7 (verze 32-bit i 64-bit), ale měly by být nezávislé na platformě.

V dalším textu budiž pNCBIdb označením pro proteinovou (*non redundant protein sequences (nr)*) databázi umístěnou na serveru NCBI. Zkratka NCBIdb je vyhrazena pro obsah všech databází NCBI.



Obrázek 3.1: Schéma zachycující jednotlivé kroky hledání barevných genů v transkriptomu krásnoočka druhu *R. costata*. Modré obdélníky znázorňují jednotlivé kroky analýzy, žluté elipsy použité databáze, červený čtverec rozhodování programu, zelené trojúhelníky rozhodování člověka a červené obdélníky konečné výstupy (V – počet vyřazených elementů). Zkratky v modrých obdélnících jsou zkratkami programů uvedenými u jednotlivých skriptů v textu, kde je také podrobně vysvětlena jejich funkce.

Transkriptom je obecně množina všech mRNA jednoho organismu (např. transkriptom člověka je množina všech mRNA člověka). Transkriptomem je v dalším textu rozuměna výhradně množina sekvencí získaná sekvenováním veškeré vyizolované mRNA krásnoočka druhu *Rhabdomonas costata*, transkriptem pak jednotlivé sekvence transkriptomu.

Schéma znázorňující jednotlivé kroky analýzy viz Obr. 3.1.

3.5.1 Krok první – sekvenční analýza transkriptu (SAT)

Blástováním transkriptomu proti pNCBIdb s využitím programu `blastx` z balíku programů Blast2Go (B2G) byla pro každý transkript (vstupní sekvenci) získána uspořádaná množina nejpodobnějších sekvencí (homologů) obsažených v pNCBIdb. Pořadí těchto homologů je určeno mírou podobnosti se vstupní sekvencí. Program `blastx`, který blástuje nukleotidové sekvence přeložené ve všech šesti čtecích rámcích proti databázím aminokyselinových sekvencí, byl použit v základním nastavení. Míra podobnosti sekvencí je dána mj. skórovací maticí a „pokutou“ za vytvoření nebo rozšíření „mezery.“

Výstupem programu `blastx` byl v našem případě mj. soubor `Rhabdomonas_polyA.txt` obsahující pro každý transkript název nejlepšího hitu. Název hitu obvykle obsahuje taxon, do kterého patří organismus, ze kterého byla sekvence izolována.

3.5.2 Krok druhý – GetRidofBacteria (GRoB)

Hlavním důvodem pro odstranění prokaryotických sekvencí z transkriptomu byla nejistota, že RNA použitá k sekvenování transkriptomu krásnoočka *R. costata* nebyla prosta bakteriální kontaminace, protože *R. costata* nebyl pěstován v axenické kultuře. K dalším důvodům patří výrazná časová úspora v dalších krocích.

K odstranění prokaryotických transkriptů slouží skript `GetRidofBacteria.py`, který využívá jako vstupní data soubory `454AllContigs.fna` a `Rhabdomonas_polyA.txt` a dva slovníky. První slovník `Prokaryota.dic` obsahuje všechny organismy obsažené v NCBIdb patřící mezi Prokaryota v podobě rodového, druhového a případně kmenového názvu organismu, např. *Microcystis* sp. AN106-CH, tj. přesně v tom formátu, který lze získat z NCBI. Druhý slovník `Eukaryota.dic` obsahuje všechna Eukaryota obsažená v NCBIdb ve stejném formátu. Skript porovnáním názvů prvních homologů s obsahem slovníků rozhoduje o zařazení mezi eukaryotické, resp. prokaryotické sekvence a zapíše je do souboru `Eukaryota.out`, resp. `Prokaryota.out`. Existují také sekvence nepřiraditelné ani do jedné kategorie (např. umělé), ty se zapisují do souboru `Unknown.out`.

Dva slovníky jsou nezbytné, neboť NCBIdb obsahuje spoustu „matoucích“ taxonů, např. *Wolbachia endosymbiont of Saribia tepahi*, a tak zároveň slouží ke kontrole. Skript `GetRidofBacteria.py` je spuštěn dvakrát. Při prvním spuštění hledá nejprve v `Prokaryota.dic` a pak teprve v `Eukaryota.dic`. Při druhém spuštění je pořadí slovníků vyměněno. Jsou-li oba výstupní soubory z prvního spuštění stejné jako soubory z druhého spuštění, proběhlo třídění správně.

3.5.3 Krok třetí – STEPAdb

Protože pNCBIdb je silně redundantní, použili jsme databázi STEPAdb, kterou vytvořila Štěpánka Hrdá. STEPAdb obsahuje sekvence organismů uvedených v Tabulce 3.1. Do naší databáze jsme vybírali organismy s již známým genomem a organismy ze skupin, kde není osekvenován žádný genom, takovým způsobem, aby všechny vyšší eukaryotické skupiny byly pokud možno rovnoměrně zastoupeny. Ve STEPAdb je součástí jména každé sekvence vyšší taxonomická skupina organismu (zde označená jako kmen), ze kterého sekvence pochází, např. Rhodophyta, Archaea, Viridiplantae atp.

3.5.4 Krok čtvrtý – lokální BLAST (IBLAST)

Eukaryotické transkripty jsme nablástovali proti STEPAdb. Každému transkriptu se blástováním přiřadilo nejvýše 500 nejpodobnějších sekvencí ze STEPAdb, které jsou řazeny dle významnosti vyjádřené parametrem e (e -hodnotou, e -value, $expect$ -value).

Jediný soubor (`RhabdomonasWithoutBacteria.lbr`) je jedním z výsledků lokálního blástoování. Tento soubor obsahuje všechny hity pro všechny transkripty – na každém řádku jeden hit ve speciálním formátu, který obsahuje jméno transkriptu a e -hodnotu.

3.5.5 Krok pátý – QBlastSorting (QBS)

Skript QBlastSorting.py je mírně upraveným skriptem BlastSorting.py jehož autorem je Vladimír Hampl. Ze souboru `RhabdomonasWithoutBacteria.lbr` vybere skript QBlastSorting.py pro každý transkript pět nejlepších hitů tak, že každý z vybraných hitů je z jiné taxonomické skupiny¹. Výstup ve formátu textové tabulky (`QBlastSorting.csv`) byl převeden programem Calc z kancelářského balíku Apache OpenOffice 3.1 na dokument Microsoft Excel 2003 (`QBlastSorting.xls`). Tabulkovým programem Microsoft Excel 2007 pak byly všechny transkripty „manuálně“ prohlédnuty a s pomocí funkce „řadit řádky“ byly vyřazeny všechny transkripty, jejichž první hity splňují podmínku

$$e > 10^{-10}. \quad (3.3)$$

Postupně byly vyřazeny také transkripty, jejichž barevný hit byl horší než hit nepocházející ze skupiny Euglenozoa a zároveň tento barevný hit splňoval podmínku 3.3. Ponechány byly pouze ty transkripty (celkem 359), u nichž barevnému hitu předchází hit náležející organismu ze skupiny Euglenozoa nebo nic, tj. barevný hit byl hitem nejlepším. Jedná se tedy o transkripty genů, které mohly být získány endosymbiotickým genovým přenosem z řasy.

¹Tyto skupiny jsou definovány ve STEPAdb.

kmen	počet rodů	počet taxonů	počet sekvencí
Alphaproteobacteria	8	11	42 226
Actinobacteria	7	8	29 119
CFB	7	8	31 846
Cyanobacteria	7	13	54 576
Firmicutes	5	10	26 460
Gammaproteobacteria	7	8	28 576
Spirochetes	4	8	21 076
ostatní Eubacteria	8	18	46 470
Archaea	7	22	43 675
Amoebozoa	5	14	41 833
Choanoflagellata	2	2	38 429
Metazoa	6	15	158 372
Fungi	14	20	107 908
Glaucophyta	2	2	32 167
Rhodophyta	500	2 843	19 230
Viridiplantae	14	19	309 530
Cryptophyta	22	66	29 936
Haptophyta	43	200	1 928
Heterokontophyta	9	19	41 201
Alveolata	19	58	170 460
Rhizaria	102	164	3 484
Kinetoplastea	20	85	183 495
Diplonemea	2	2	11 174
Euglenoidea	3	3	31 011
ostatní Excavata	5	6	80 440
celkem	828	3 624	1 584 622

Tabulka 3.1: Zastoupení jednotlivých taxonů ve STEPAdb. Taxonem je rozuměn druh, případně kmen. CFB jsou bakterie příslušející kmenům Bacteroidetes, Chlorobi a Fibrobacteres. Počet sekvencí je celkový počet EST a proteinů.

3.5.6 Krok šestý – EachChoosenContigOwnFile (ECCOF)

Úkolem skriptu `EachChoosenContigOwnFile.py` je všechny hity ze STEPAdB, příslušné jednotlivým 359 vybraným transkriptům, zapsat do samostatných souborů. Zapisovány jsou pouze názvy sekvencí nikoliv sekvence samotné.

3.5.7 Krok sedmý – GetChoosenFasta (GCF)

V dalším kroku bylo nutné ze STEPAdB a transkriptomu získat sekvence pro každý z 359 transkriptů a zapsat je do 359 FASTA souborů. FASTA soubor je obyčejný, speciálně formátovaný, textový soubor, který obsahuje sekvence (nukleotidové nebo aminokyselinové) a jejich názvy. Proteinové sekvence jsou zaznamenány jednopísmennými zkratkami aminokyselin. Název sekvence začíná znakem > a je na jednom samostatném řádku. Samotná sekvence je pak zapsána po cca 70 znacích na řádek. Zároveň musely být transkripty přeloženy ve stejném čtecím rámci v jakém byl nalezen nejlepší hit ze STEPAdB. Ke splnění těchto úkolů byl vytvořen skript `GetChoosenFasta.py`.

Do FASTA souborů však nebyly zapisovány všechny hity. Měl-li jeden konkrétní taxon více hitů, pak byl do FASTA souboru zapsán pouze nejlepší z nich (z hitů příslušejících danému taxonu).

3.5.8 Krok osmý – GiveUniqueNameForFasta (GUNff)

Netriviálním technickým problémem při automatizované konstrukci fylogenetických stromů z velkého množství sekvencí jsou jejich názvy. Některé programy k tvorbě fylogenetických stromů, např. RAXML, vyžadují vstupní soubory ve formátu PHYLIP 4.0. Tento formát rozlišuje jen prvních deset znaků v názvu sekvence a ostatní ignoruje (ty se už ve výstupu nevyskytují). Tyto názvy musí být jedinečné. Proto skript `GiveUniqueNameForFasta.py` přejmenovává sekvence tak, aby jejich názvy byly nejen jedinečné, ale také lidskému oku srozumitelné. Např.

```
>fungi_gi|6323142|ref|NP_013214.1|_Hog1p_[Saccharomyces_cerevisiae]
```

změní na

```
>76fungi,
```

kde číslo na začátku nového názvu oznamuje pořadí sekvence v souboru FASTA a tím zajišťuje jednoznačnost názvu této sekvence.

3.5.9 Krok devátý – AlignByMuscle (AbM)

Po přejmenování všech sekvencí byly přípravy k zarovnávání sekvencí (angl. sequence alignment) hotovy.

Existuje několik programů zarovnávajících sekvence, např. ClustalW (THOMPSON, GIBSON a HIGGINS 2002), MAFFT (KATO, ASIMENOS a TOH 2009) či Muscle (EDGAR

2004). Vzhledem k velkému množství souborů (359), jejichž sekvence se musí zarovnat, byla hlavní podmínkou výběru vhodného programu možnost ovládat program z příkazové řádky (cmd, *command line*). Byl zvolen program Muscle, jehož velkou předností je rychlost.

Jedinou prací skriptu `AlignByMuscle.py` bylo sázet do programu Muscle jeden soubor za druhým. Výstupem je 359 souborů se zarovnanými sekvencemi ve formátu PHYLIP 4.0, např. `00450.phy`, kde číslo označuje konkrétní *contig*.

3.5.10 Krok desátý – TrimmedByTrimAl (TbTA)

TrimAl v1.2 (CAPELLA-GUTIÉRREZ, SILLA-MARTÍNEZ a GABALDÓN 2009) je program pro automatické odstraňování (ořezávání) špatně zarovnaných částí alignmentů. Má bohaté možnosti nastavení a hlavně funguje v příkazové řádce. Jeho výstupem je nejen soubor s ořezaným alignmentem, ale také soubor ukazující co bylo odstraněno. Funkce skriptu je stejná jako v předchozím případě.

Z 359 alignmentů jsme po ořezání manuálně vybrali 170 alignmentů kvalitou vhodných pro fylogenetickou analýzu.

3.5.11 Krok jedenáctý – RAxML

RAxML 7.2.8 (*Randomized Accelerated Maximum Likelihood*) (STAMATAKIS, HOOVER a ROUGEMONT 2008) je program, který počítá fylogenetické stromy metodou *maximum likelihood* (FELSENSTEIN 1981).

Přestože existuje cmd verze, pro výpočty 170 stromů byla použita verze webová, která je podstatně rychlejší. Výpočet jednoho stromu trval průměrně 30 hodin, zatímco v příkazové řádce kolem 120 hodin. Z možností nastavení v *on-line* formuláři² byly vybrány (zaškrtnuty) tři – *Gamma-model rate of heterogeneity*, *protein sequence* a *ML search*.

170 vzniknuvších stromů jsme manuálně prohlédli a roztřídili do dvou skupin. Do první skupiny padly stromy, v nichž se větev obsahující krásnoočko *R. costata*, případně další zástupce skupiny Euglenozoa, avšak žádné jiné organismy, větví s barevnými organismy (74 stromů). Do druhé skupiny jsme zařadili všechny ostatní fylogenetické stromy a vyřadili je z další analýzy (96 stromů).

3.5.12 Krok dvanáctý – konfrontace s literaturou

Vyšlo několik vědeckých článků, které se zabývají minulou existencí plastidu u bičivky (Kinetoplastea) a tuto existenci dokládají přítomností typicky barevných genů u ničivky a trypanosom, viz výše. Sedmáct genů podezřelých z barevného původu jsme se také pokusili vyhledat v transkriptomu. Aby vyhledávání sekvencí v transkriptomu bylo efektivní, byla vytvořena databáze RHABDOdb pomocí programu `makeblastdb`, jež je součástí balíku programů `blast2.2.28`, který lze stáhnout z webových stránek NCBI.

²Viz <http://phylobench.vital-it.ch/raxml-bb/>.

Blástováním 17 genů proti RHABDOdb bylo zjištěno, že 9 genů má v transkriptomu homology. Podrobnosti viz kapitolu 4.2 a Tab. 4.2.

Devět transkriptů, odpovídajících devíti výše uvedeným genům, bylo blástováno proti STEPAdb (krok čtvrtý) a byly z nich vytvořeny FASTA soubory (krok šestý a sedmý).

3.5.13 Krok třináctý – BestTrees

74 FASTA souborů, odpovídajících námi vybraným barevným kandidátům, a 9 FASTA souborů, odpovídajících 9 kandidátům z literatury, bylo obohaceno o sekvence homologů z NCBIdb. Tyto homology byly nalezeny webovou verzí programu BLAST (konkrétně blastp2.2.28). Obohacené FASTA soubory prošly znovu kroky 7–11, aby byly získány „nové,“ na taxony bohatší fylogenetické stromy. Viz schéma na Obr. 3.1.

Z blížeji neurčitelných důvodů musel být v sedmém kroku program Muscle nahrazen programem MAFFT (AbM).

4.1 Světelná a elektronová mikroskopie

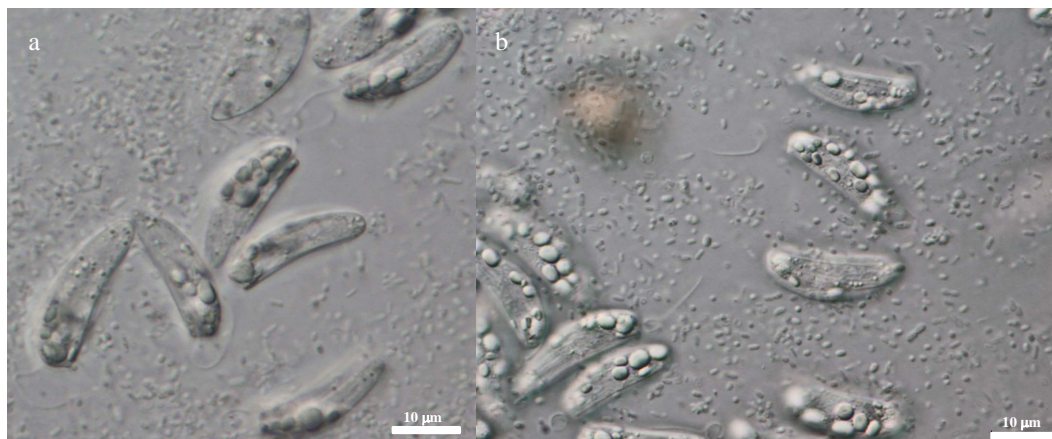
Optickým mikroskopem Olympus BX51 vybaveným kamerou Olympus DP70 při nastavení Nomarského diferenciálního interferenčního kontrastu bylo vyfotografováno na 40 snímků krásnoočka *Rhabdomonas costata*, viz Obr. 4.1. Tyto snímky sloužily k identifikaci druhu rodu *Rhabdomonas*, který byl určen na základě velikosti a tvaru buňky, poměru délky bičíku a délky vlastní buňky.

Na rastrovacím elektronovém mikroskopu JEOL JSM-6380LV bylo nafoceno na 30 snímků kmene PANT2, viz Obr. 4.2. Tyto snímky sloužily k identifikaci druhu rodu *Rhabdomonas*.

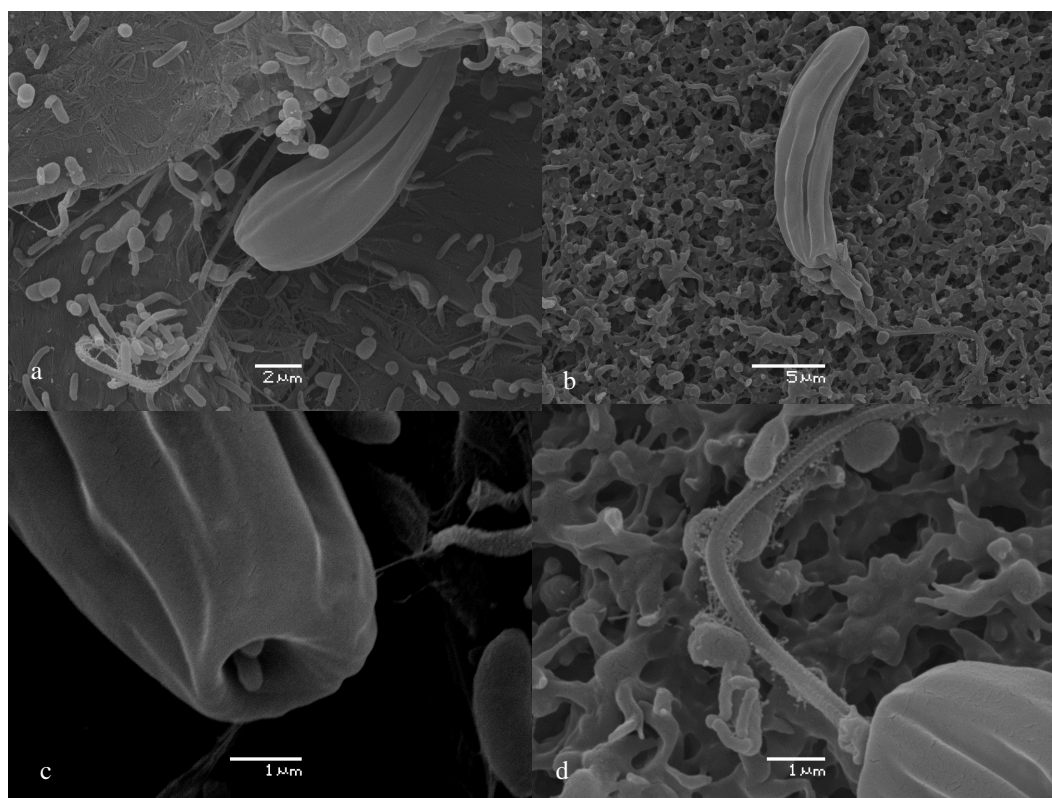
Na transmisním elektronovém mikroskopu JEOL JEM-1011 s CCD kamerou Veleta a akvizčním softwarem Olympus Soft Imaging Solution GmbH bylo vyfotografováno na 200 snímků zachycujících ultrastrukturu krásnoočka *Rhabdomonas costata*. Při fotografování byl kladen důraz na cytoskeletální systém, bičíky, paraflagelární kapsu a různé typy váčků, které by mohly být pozůstatkem plastidu. Na obrázcích, které zachycují buňku *R. costata* jako celek není patrná žádná struktura odpovídající chloroplastu, viz Obr. 4.3a, c, 4.4a, b. Objevili jsme několik struktur o jejichž podstatě mnoho nevíme. Jednou z nich je membránou obklopený téměř dokonale sférický váček, který byl přítomen u velkého množství buněk, viz Obr. 4.5a. Také o vláknitých strukturách, které byly téměř vždy asociovány s Golgiho aparátem a často také s mitochondriemi, viz Obr. 4.5b, c, d, nemůžeme říci nic víc.

4.2 Fylogenetické analýzy

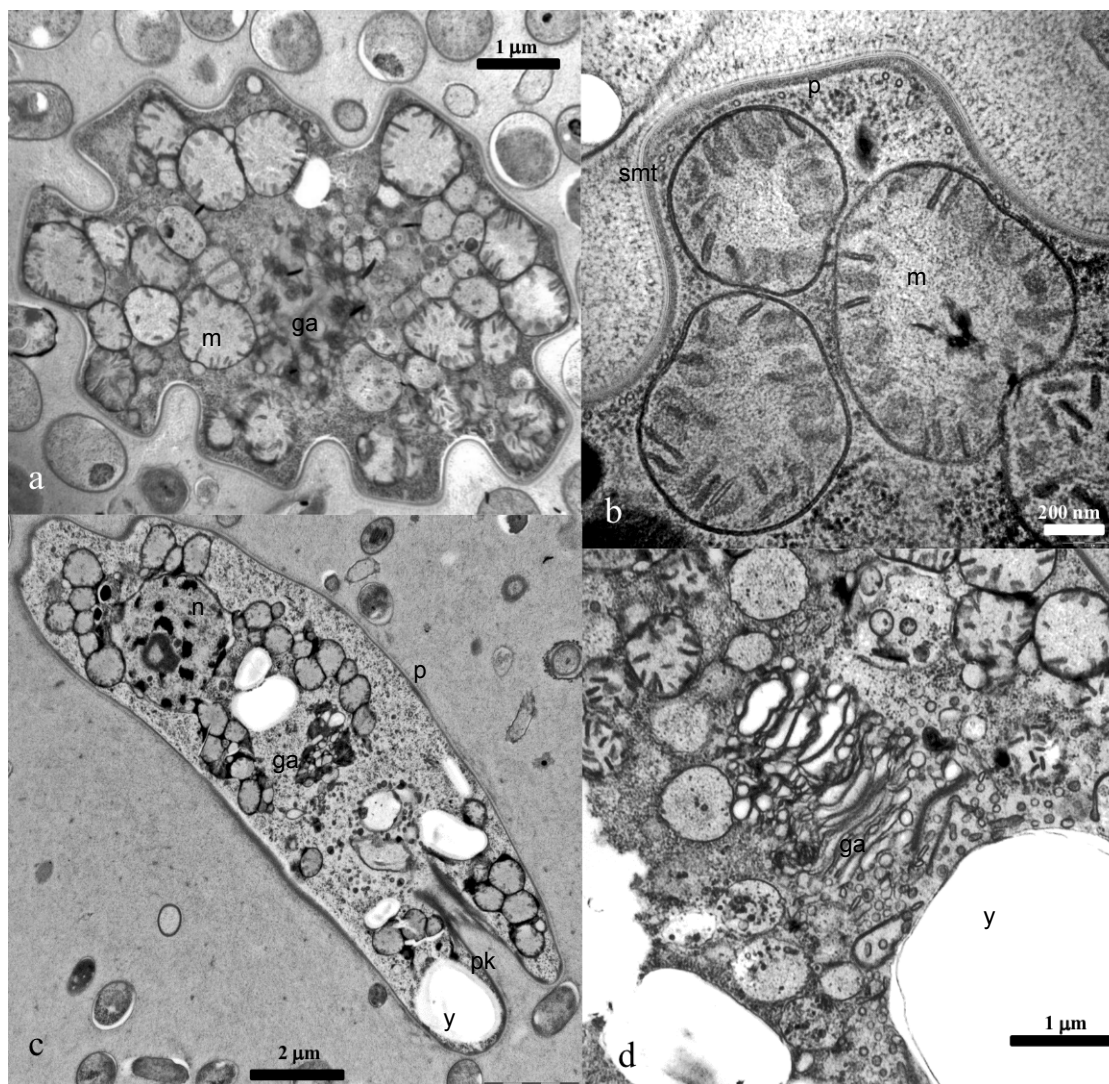
Z 8 365 transkriptů bylo 6 930 zařazeno mezi eukaryotické, avšak pouze 6 258 transkriptů, které byly delší 99 nukleotidů, bylo dále analyzováno. Po ručním třídění výsledků programu QBLASTSorting.py jsme získali 359 transkriptů vybraných na základě kritérií uvedených v kapitole 3.5.5. Z 359 alignmentů jsme po ořezání, viz kapitolu 3.5.10,



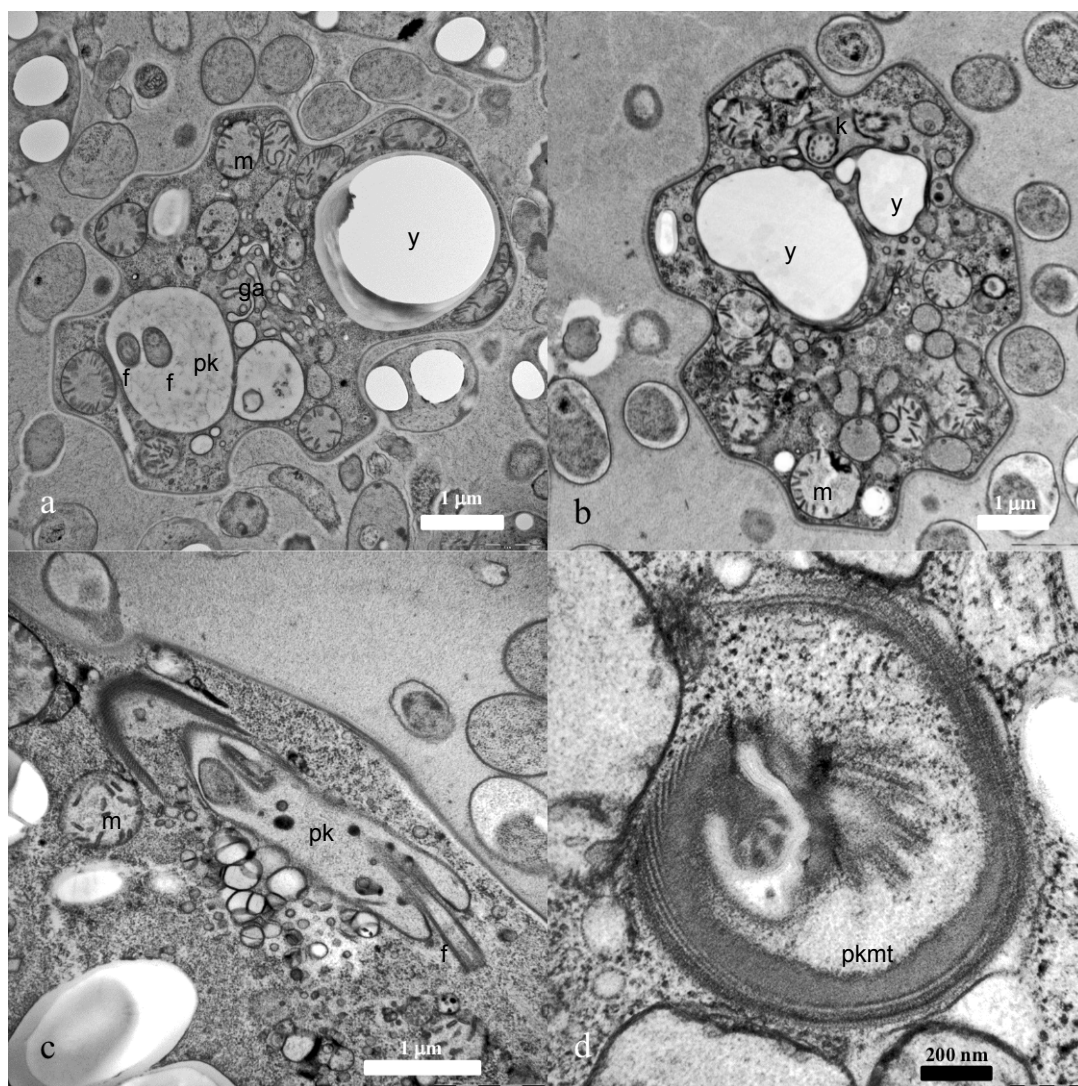
Obrázek 4.1: *R. costata* v optickém mikroskopu. Za pozornost stojí poměr délky bičíku k délce vlastní buňky (a), protože jde o determinální znak, a pelikulární pásy (b). Měřítka je dáno obdélníkem u každého obrázku.



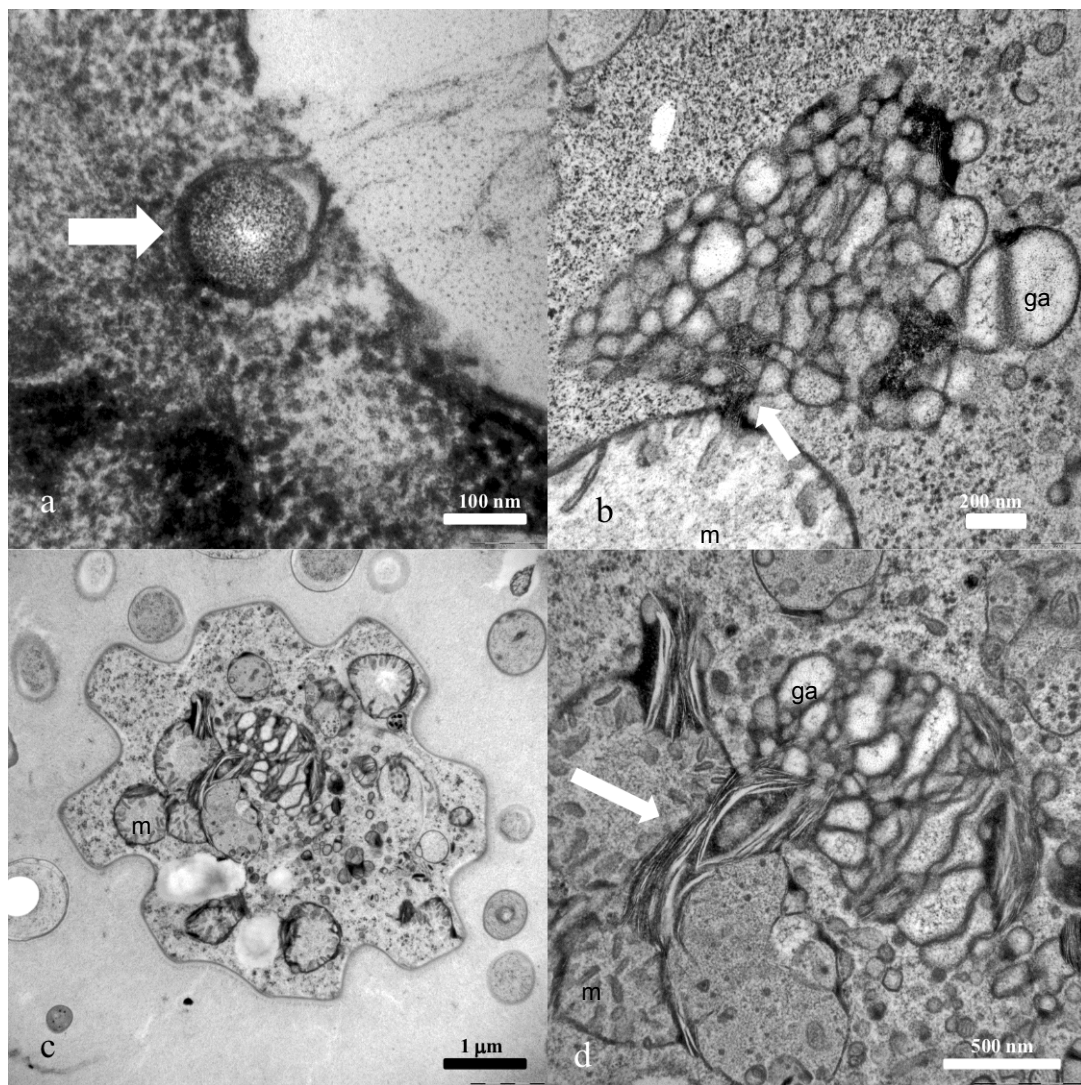
Obrázek 4.2: *R. costata* v rastrovacím elektronovém mikroskopu. Za pozornost stojí poměr délky bičíku k délce vlastní buňky (a, b), pelikulární pásy (a, b, c, d) a vnější struktura bičíku (d). Zachycen je také vstup do paraflagelární kapsy (c), kde je vidět nejen pozůstatek ulomeného hlavního bičíku, ale také celý bičík nevystupující z paraflagelární kapsy. Měřítka je dáno obdélníkem u každého obrázku.



Obrázek 4.3: Transmisní elektronová mikroskopie *R. costata*. Příčný řez buňkou (a), detail pelikuly (b), podélný řez buňkou (c) a detail Golgiho aparátu. Písmena v obrázcích označují mitochondrie (m), Golgiho aparát (ga), subpelikulární mikrotubuly (smt), pelikulu (p), jádro (n), periflagelární kapsu (pk) a díru vzniklou rozpadem paramylonového zrnak (y). Měřítka jsou uvedena u každého obrázku.



Obrázek 4.4: Transmisní elektronová mikroskopie *R. costata* – bičíky a peritrichální kapsa. Příčný řez buňkou (a, b), detail podélného řezu peritrichální kapsou (c) a detail příčného řezu peritrichální kapsou (d). Písmena v obrázcích označují mitochondrie (m), Golgiho aparát (ga), bičík (f), bazální tělíska (k), peritrichální kapsu (pk), mikrotubuly vyztužující peritrichální kapsu (pkmt) a díru vzniklou rozpadem paramylonového zrna (y). Měřítka jsou dána obdélníky u každého obrázku.



Obrázek 4.5: Transmisní elektronová mikroskopie *R. costata* – neidentifikované buněčné struktury. Šipka ukazuje na jednou membránou obalený váček (a), podivné vláknité struktury (b, c, d) asociované s Golgiho aparátem a mitochondriemi. Písmena v obrázcích označují mitochondrie (m) a Golgiho aparát (ga). Měřítko je dáno obdélníkem u každého obrázku.

	modrá	zelená	červená	kombinace	celkem
celkový počet stromů n	4	14	27	18	63
průměr \bar{b}	33,00	36,93	35,22	58,00	
max b	55,00	91,00	95,00	100,00	
min b	9,00	1,00	0,00	4,00	

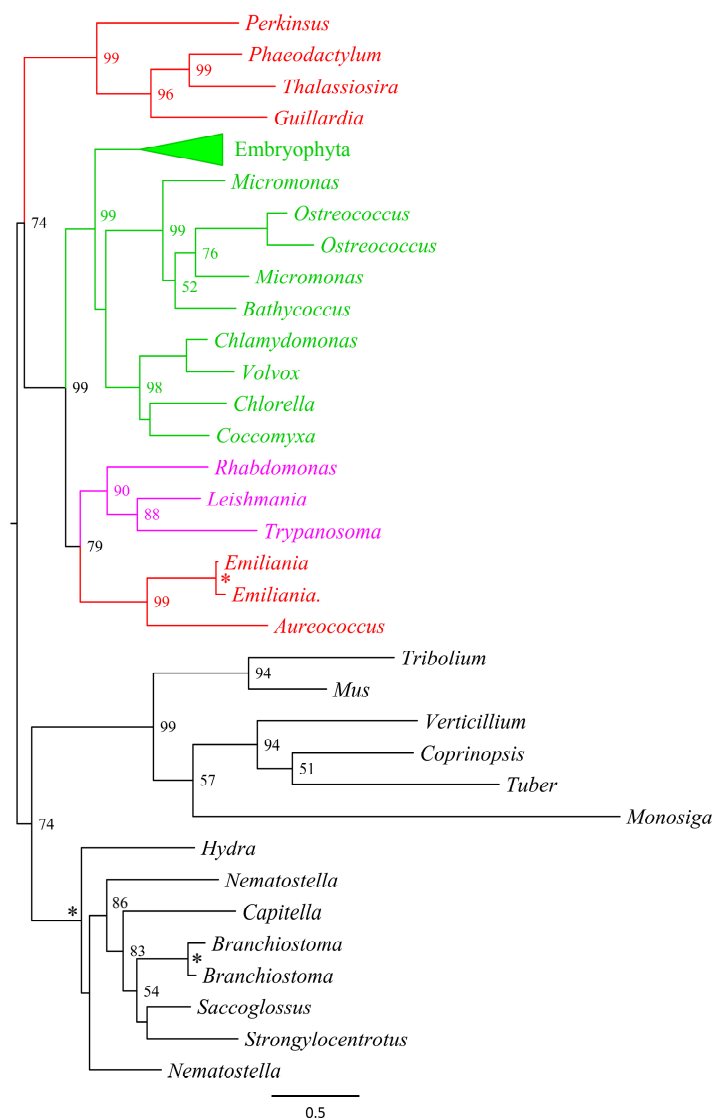
Tabulka 4.1: Celkový počet transkriptů, které mohou být odvozeny od barevného organismu. Statistické proměnné se týkají tzv. *bootstrap* hodnot b , které pocházejí z výpočtů stromů metodou *maximum likelihood*. Transkripty jsou rozděleny do skupin, podle taxonů, které jim byly sesterské. Modrá – Glaucophyta, zelená – Viridiplantae, Chlorarachniophyta, červená – Rhodophyta, Cryptophyta, Haptophyta, Ochrophyta, Apicomplexa a Dinophyta.

	modrá	zelená	červená	kombinace	celkem	R	RK	RE	REK
$b \geq 0$	4	14	27	18	63				
$b \geq 50$	2	4	6	10	22	14	4	3	1
$b \geq 75$	0	1	4	6	11	7	2	1	1
$b \geq 90$	0	1	1	3	5	4	0	0	1

Tabulka 4.2: Celkové počty stromů transkriptů, které mohou být odvozeny od barevného organismu. Uvedeny jsou počty stromů s různými *bootstrap* hodnotami b , které pocházejí z výpočtů stromů metodou *maximum likelihood*. Transkripty jsou rozděleny do skupin, podle taxonů, které jim byly sesterské. Modrá – Glaucophyta, zelená – Viridiplantae, Chlorarachniophyta, červená – Rhodophyta, Cryptophyta, Haptophyta, Ochrophyta, Apicomplexa a Dinophyta. Poslední čtyři sloupce vyjadřují, jaká část Euglenozoa byla sesterská barevným organismům. R – pouze *R. costata*, RE – *R. costata* a další zástupci Euglenoidea, RK – *R. costata* a zástupci třídy Kinetoplastea, REK – *R. costata* a zástupci třídy Euglenoidea i třídy Kinetoplastea.

manuálně vybrali 170 alignmentů kvalitou vhodných pro další fylogenetickou analýzu. Ze 170 fylogenetických stromů byl v 74 případech *Rhabdomonas* (a případně další Euglenozoa) sesterský organismům obsahujícím plastid. Alignmenty těchto 74 genů byly následně obohaceny o další homologы z NCBIdb a znovu analyzovány. V 11 případech obohacených fylogenetických stromů nebyl *Rhabdomonas* sesterský organismům obsahujícím plastid, ale zbylých 63 kandidátů na geny endosymbiotického původu (tj. 1 %) bylo potvrzeno, viz Tab. 4.1.

Z 63 transkriptů bylo 42 v příslušných fylogenetických stromech sesterských barevných taxonů. V 21 případech byl transkript krásnoočka druhu *Rhabdomonas costata* na fylogenetických stromech sesterský sekvencím dalších krásnooček (Euglenoidea), případně bičivek (Kinetoplastea) a celá větev Euglenozoa pak byla sesterská sekvencím barevných organismů, viz např. Obr. 4.6. Statistická podpora byla nezanedbatelná ($b \geq 50$) v 22 případech, dobrá ($b \geq 90$) pak v 5 případech, viz Tab. 4.2. Nejčastěji byla Euglenozoa (při $b \geq 50$) sesterská skupinám, které obsahovaly promíchané zelené i červené



Obrázek 4.6: Fylogenetický strom genu patřícího do rodiny acetyl transferáz sestavený metodou *maximum likelihood* programem **RAxML** z alignmentu o délce 541 aminokyselin. Čísla na uzlech vyjadřují statistickou podporu (*bootstrap*, *b*) pro $b > 50$, hvězdička zastupuje absolutní podporu.

zkratka	název enzymu	lokalizace enzymu v řasách	lokalizace enzymu v bičiv- kách	$-\log e$
ACP	acyl carrier protein	plastid	?	15
ADK	adenylát kináza	plastid	glykosom	17
FBP	fruktóza-1,6-bisfosfatáza	plastid	glykosom	76
GAPDH	glyceraldehydfosfát dehydrogenáza	plastid	glykosom	94
MDH	α -hydroxykyselina dehydrogenáza	cytosol	?	26
PGK	fosfoglycerát kináza	plastid	glykosom	167
SBP	sedoheptulózoa1,7-bisfosfatáza	plastid	glykosom	17
SOD	superoxid dismutáza	plastid	glykosom	50
VHPP	vakuolární proteinová pyrofosfatáza	vakuola	?	inf

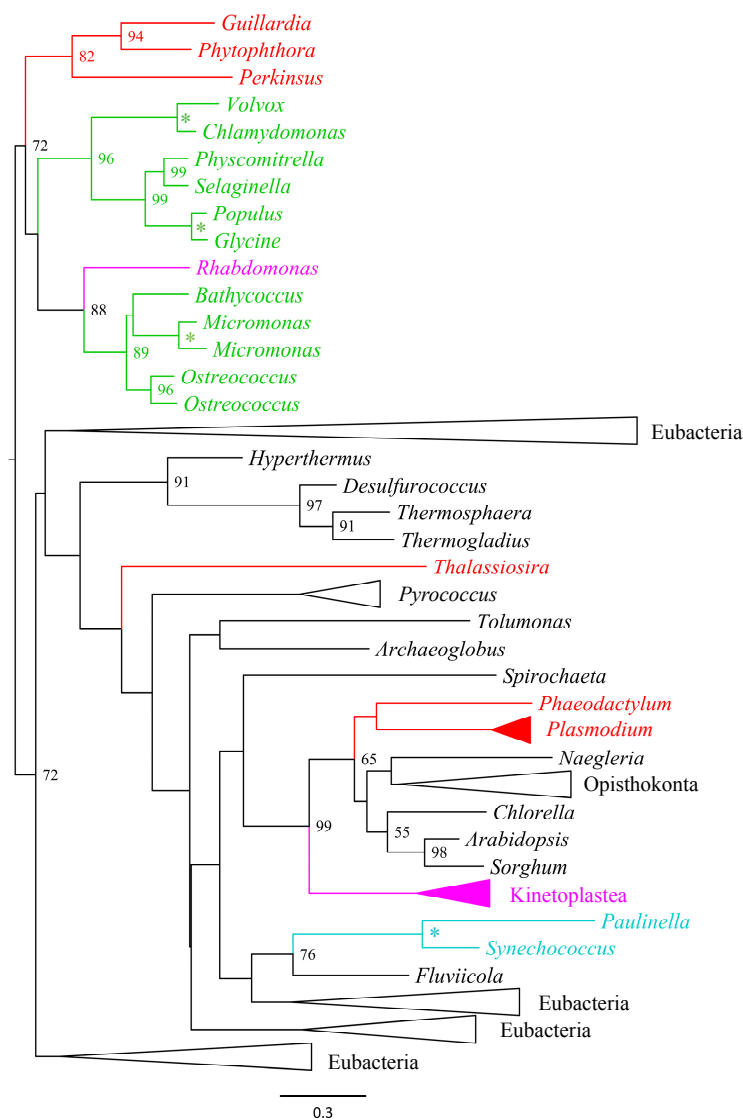
Tabulka 4.3: Proteiny nalezené v transkriptomu krásnoočka *R. costata*, které jsou v literatuře uváděny jako náznaky existence plastidu u předka ničivek a trypanosom. Převzato z HANNAERT, SAAVEDRA et al. 2003 a upraveno. V posledním sloupci je uvedena hodnota $-\log e$, která udává míru homologie transkriptu *R. costata* s příslušným transkriptem bičivek.

organismy, tj. v 10 případech z 22 (45 %), v 6 případech (27 %) pak pouze s červenou linií řas, ve 4 případech (18 %) pak pouze se zelenou linií řas a ve 2 případech dokonce pouze se zástupci skupiny Glaucophyta. Ve třech stromech se mezi krásnoočka rodů *Rhabdomonas* a *Euglena* vmísily zástupci řádu Mamiellales.

K podrobnějšímu rozboru byly vybrány dva příklady transkriptů krásnoočka *R. costata* s možným barevným původem. Protože žádný z níže uvedených proteinů, resp. transkriptů pro proteiny, nebyl biochemicky testován, jsou všechny tyto proteiny (a jejich funkce) pouze předpokládány na základě výsledků programu BLAST.

Na Obr. 4.6 je zachycen fylogenetický strom proteinu patřícího mezi acetyl transferázy; k jeho výpočtu byl použit alignment o délce 541 aminokyselin ze 110 taxonů. Samotný protein je hodně konzervovaný a krásnoočí sekvence je pravděpodobně víc než dostatečně kvalitní, tj. při blástování transkriptu proti NCBIdb byly získány e-hodnoty „hitů“ v intervalu $-\log e \in \langle 85, 127 \rangle$. Kromě 14 taxonů¹ patřících mezi Metazoa a 3 zástupců Euglenozoa (*Rhabdomonas*, *Trypanosoma* a *Leishmania*), byly všechny taxony barevné. Nejvíce jsou zastoupeny vyšší rostliny (Embryophyta) – 59 taxony v 18 rodech (zeleně zkolabováno). Sesterskou větev skupiny Euglenozoa tvoří *Aureococcus anophagefferens* (Ochrophyta: Pelagophyceae) a *Emiliania huxleyi* (Haptophyta: Prymnesiophyceae) se středně silnou statistickou podporou ($b = 76$). Tomuto souvětví je pak

¹Taxonem zde není míněn nositel genu, případně jeho proteinového produktu, nýbrž tento gen, případně jeho produkt samotný.



Obrázek 4.7: Fylogenetický strom genu pro spermidin syntázu sestavený metodou *maximum likelihood* programem RAxML z alignmentu o délce 250 aminokyselin. Čísla na uzlech vyjadřují statistickou podporu (*bootstrap*, *b*) pro $b > 50$, hvězdička zastupuje absolutní podporu.

sesterská větev zahrnující zástupce Archaeplastida, dobře rozdělených na Streptophyta a Chlorophyta. Strom je nezakořeněný, ale i přesto je vidět, že Euglenozoa (budeme-li je považovat za monofyletickou skupinu) jednoznačně sedí mezi barevnými taxony.

Spermidin syntáza, jejíž možná fylogeneze je zobrazena na Obr. 4.7, je enzymem, který je rozšířen mezi všemi organismy, a také příkladem, ve kterém není *Rhabdomonas* sesterský ostatním zástupcům skupiny Euglenozoa. Kvalita krásnoočího homologu spermidin syntázy je nižší než v předchozím případě ($-\log e \in \langle 24, 34 \rangle$). Krásnoočka *R. costata* je sesterské čeledi Mamiellaceae (Chlorophyta: Mamiellales) s dobrou statistickou podporou ($b = 88$). S nízkou statistickou podporou je toto souvětví sesterské ostatním Archaeplastida. Strom je opět nezakořeněný. Pozice krásnoočka je mezi zelenými taxony. Podivná je ovšem pozice skupiny Kinetoplastea (13 taxonů). Za povšimnutí stojí, že *Paulinella* je v tomto fylogenetickém stromě sesterská sinici rodu *Synechococcus* s absolutní podporou, což odpovídá předpokládanému fylogenetickému původu chromatoforů.

Ze 17 v literatuře nalezených genů, potenciálně pocházejících z barevných organismů, jich bylo celkem devět nalezeno v transkriptomu krásnoočka druhu *R. costata*, viz Tab. 4.3. Při konstrukci fylogenetických stromů však dobrou statistickou podporu jako sesterské barevným taxonům nevykazovaly. VHPP krásnoočka a bičivek je sesterské zelené linii řas s nižší statistickou podporou ($b = 27$) i červené linii řas, která je však doplněna bakteriemi a nebarevnými eukaryoty. ADK krásnoočka se větví mezi rody *Monosiga* a *Salpingoeca* (Opisthokonta: Choanoflagellata) s nízkou statistickou podporou ($b = 33$), zatímco „zcela nepříbuzná“ ADK bičivek je sesterská ADK barevných organismů ($b = 18$). GAPDH krásnooček, bičivek a skupiny Symbiontida se větví s bakteriemi ($b = 59$) a jeden zástupce řádu Clostridiales (Eubacteria: Firmicutes) je dokonce uvnitř Euglenozoa. Fylogenetický strom pro SOD krásnoočka vykazoval nízkou statistickou podporu většiny větvení; Euglenozoa jsou sesterskou skupinou větve obsahující *Ectocarpus* a Apicomplexa s nízkou statistickou podporou ($b = 8$). Ve fylogenetických stromech PGK, ACP, MDH, SBP a FBP nejsou krásnoočka a bičivky sesterské barevným organismům.

Diskuse výsledků

K testování hypotézy pozdního nabytí plastidů (angl. *plastid-late hypothesis*) krásnooček, která tedy představuje nulovou hypotézu H_0 , byl vybrán *Rhabdomonas costata* z několika důvodů. V první řadě je to osmotrofní způsob výživy a s ním spojená neschopnost přijímat velká množství genetických informací z prostředí, které by potenciálně mohly být inkorporovány do genomu, a tak negativně ovlivňovat fylogenetické analýzy (DOOLITTLE 1998; LEANDER, ESSON a BREGLIA 2007). K dalším důvodům patří relativně snadná kultivace a vysoká rychlost množení *R. costata*.

Transmisním elektronovým mikroskopem jsme získaly na 200 snímků. Na žádném jsme však nepozorovali struktury, které by odpovídaly plastidům, přesto nemůžeme přítomnost rudimentárních plastidů vyloučit. Objevili jsme však podivné provázkovité struktury, které byly vždy asociovány s Golgiho aparátem a někdy také s mitochondriemi. Tyto struktury nejsme schopni interpretovat.

Analýzou neúplného transkriptomu osmotrofního krásnoočka *Rhabdomonas costata* jsme získali přibližně 10 % transkriptů, které mohou pocházet z barevných organismů. Transkriptů s potenciálně červeným původem (27) je přibližně dvakrát více, než se zeleným původem (14).

Podle současných znalostí prodělal předek fotosyntetických krásnooček sekundární endosymbiózu se zelenou řasou. Obvykle se předpokládá, že endosymbióza proběhla po odštěpení osmotrofních krásnooček, tzv. hypotéza pozdního nabytí plastidu (angl. *plastid-late hypothesis*). Konkurenční teorií je hypotéza o raném nabytí plastidu (angl. *plastid-early hypothesis*), která předpokládá, že plastid byl získán dříve, např. u společného předka Euglenoidea a Kinetoplastea (HANNAERT, SAAVEDRA et al. 2003). Existují i práce zabývající se nabitím a ztrátou červeného plastidu v dávné minulosti (TRIPODI, BUTTIGLIERO et al. 2006).

Předpokládejme, že krásnoočka, resp. Euglenozoa, neprodělala endosymbiózu se zástupcem červené linie řas. Pak můžeme přítomnost červených transkriptů vysvětlit např. horizontálním genovým transferem (HGT), o jehož četnosti v přírodě nemáme dostatečné údaje. Dalším vysvětlením mohou být chyby v analýze způsobené převážně nedo-

statečnými vstupními daty; tj. kdyby použité databáze obsahovaly všechny transkripty, případně proteiny, všech organismů, použité evoluční modely všechny parametry atp., získali bychom přesnější výsledky. Za výše uvedeného předpokladu, můžeme považovat počet červených transkriptů za chybu „měřicího přístroje,“ kterým je v tomto případě naše analýza.

Protože počet zelených transkriptů není výrazně vyšší než počet červených transkriptů, můžeme považovat zelenou endosymbiózu za málo pravděpodobnou a připsat existenci zelených transkriptů opět HGT nebo chybě analýzy.

Pokud nevyloučíme možnost červené endosymbiózy u předka krásnooček (a případně bičívek), musíme srovnat naše výsledky s obdobnými u jiného, dobře zvoleného organismu. Protože u krásnoočka *R. costata* nebyly nalezeny žádné přímé důkazy o současné existenci plastidu, musel ho v minulosti ztratit. Organismem, u kterého se o podobné ztrátě plastidu uvažuje, je *Cryptosporidium*. Studie zabývající se hledáním molekulárních pozůstatků apikoplastu u druhu *C. parvum* našla celkem 7 genů ($s - \log e > 90$ a $b \geq 90$), které mohou pocházet z endosymbionta, resp. apikoplastu (HUANG, MULLAPUDI et al. 2004). To je srovnatelné s počtem podezřelých genů, který byl nalezen v transkriptomu krásnoočka *R. costata*. Je zajímavé, že žádný z těchto genů u prvoka rodu *Cryptosporidium* nevykazoval příbuznost s červenou linií řas.

Při hledání plastidových genů u jednoho z nejbližších příbuzných živočichů – fagotrofním bičíkovcem druhu *Monosiga brevicollis* (Opisthokonta: Choanoflagellata) – bylo nalezeno 103 genů s možným původem mezi řasami; 53 z nich bylo příbuzných genům rozsivek a skupiny Haptophyta. Protože u skupiny Opisthokonta dosud téměř nikdo o plastidové endosymbióze neuvažoval, je předpokládáno, že všechny tyto geny byly získány horizontálním genovým transferem z kořisti.

Při srovnání výsledků pátrání po barevných genech u *R. costata*, *C. parvum* a *M. brevicollis* nás může zarážet podivné rozložení množství barevných genů. U *M. brevicollis*, která obsahuje nejvíce barevných genů, se uvažuje pouze o čistě heterotrofních předcích, zatímco u *C. parvum* s velmi malým počtem barevných genů se o plastidem obdařených předcích vážně uvažuje. *R. costata* má také velmi malý počet potenciálně barevných genů, stejně jako *C. parvum*, což naznačuje podporu teorii raného nabytí plastidu. Případ *C. parvum* představuje varování, že i v genomu organismu, který v minulosti plastid měl (i když s jistotou to tvrdit nemůžeme) může být přítomno jen velmi málo genů endosymbiotického původu. Hypotézu existence plastidu u předka *R. costata* proto nelze jednoznačně vyloučit. Na druhou stranu dokud nebudou nalezeny jednoznačnější důkazy pro tuto hypotézu, a ty v naší práci nalezeny nebyly, musíme se přiklonit k nulové hypotéze, totiž že plastid u předků *Rhabdomonas* přítomen nebyl.

K rozšíření našich znalostí o historii plastidů u skupiny Euglenozoa by mohlo vést provedení podobných kvantitativních analýz výskytu barevných genů u většího počtu heterotrofních i fototrofních zástupců skupiny Euglenozoa.

Závěry

- Na základě hledání plastidu v buňkách *R. costata* transmisním elektronovým mikroskopem, které zatím nebylo důkladné, můžeme vyloučit přítomnost nápadného plastidu, avšak přítomnost rudimentárního plastidu vyloučit nemůžeme. Objevili jsme však neznámou strukturu, kterou nejsme schopni interpretovat (provázkovité struktury asociované s Golgiho aparátem a mitochondriemi).
- Sekvenováním metodou 454 jsme získali 349 918 čtení, které byly složeny do 8 365 „exonů,“ z nichž bylo 6 930 bezpochyby eukaryotických.
- Během analýzy transkriptomu *R. costata* bylo nalezeno 63 genů, u nichž je možné předpokládat, že pocházejí ze zelených (14 genů) nebo jiných (49 genů) řas. Po následné konstrukci fylogenetických stromů se ukázalo, že zeleným řasám je s vysokou podporou sesterský jen jeden transkript zatímco ostatním řasám 4 transkripty. Protože genů sesterských zeleným řasám není víc než genů sesterských ostatním řasám, domníváme se, že *Rhabdomonas* neobsahuje geny získané endosymbiotickým genovým přenosem z předka plastidu zelených krásnooček. Společný předek *R. costata* a fototrofních krásnooček tedy nejspíše neměl plastid.



Skripty použité v analýze

Budiž `C:\AnalysisOfRNA` pracovním adresářem (v dalším nahrazován `*`), pak každému z třinácti kroků náleží jeden podadresář, např. `*\01_Blast2Go`. Ke každému skriptu jsou připsány vstupní a výstupní soubory.

A.1 Krok druhý

```
1 import glob, string, os, shutil
2
3 phyla = glob.glob('*.in')
4 print('IN files found:')
5 print(phyla)
6 shutil.copy('RQ_contigs_all.fna', 'eukaryotic.out') # input file
7 fout = open('notaxa.out', 'w')
8 for group in phyla:
9     inGroup = open(group, 'r')
10    outGroupInName = group[:-3] + '.inn'
11    outGroupIn = open(outGroupInName, 'w')
12    lines = inGroup.read()
13    outGroupOutName = group[:-3] + '.out'
14    outGroupOut = open(outGroupOutName, 'w')
15    counter = 0
16    with open('eukaryotic.out') as file:
17        for line in file:
18            if line.startswith('>contig'):
19                x = 1
20                y = 12
21                contig = line[x:y]
22                print(contig)
23                result = lines.find(contig)
24                if result == -1:
25                    outGroupOut.write(line)
26                else:
27                    outGroupIn.write(line)
```



```

28         counter += 1
29     else:
30         if result == -1:
31             outGroupOut.write(line)
32         else:
33             outGroupIn.write(line)
34     n = 20 - len(group[:-4])
35     print group[:-4], ' ' * n, counter
36     outGroupIn.close()
37     file.close()
38     outGroupOut.close()
39     shutil.copy(outGroupOutName, 'eukaryotic.out')
40     fout.close()

```

A.2 Krok pátý

```

1  blasty = open('RhabdomonasWithoutBacteria.lbr', 'r')
2  Blastylines = blasty.readlines()
3  blasty.close()
4  outfile = open('QBlastSorting.csv', 'a')
5  out_line = 'Contig Number;RF of 1st Hit;Phyla of 1st Hit;ID of 1st Hit;E-
    value of 1st Hit;RF of 2nd Hit;Phyla of 2nd Hit;ID of 2nd Hit;E-value
    of 2nd Hit;RF of 3rd Hit;Phyla of 3rd Hit;ID of 3rd Hit;E-value of 3rd
    Hit;RF of 4th Hit;Phyla of 4th Hit;ID of 4th Hit;E-value of 4th Hit\n'
6  out_lines = []
7
8  Euglenoida = ['Eutreptiella', 'EuglGrac']
9  KinDip = ['Diplonema', 'trypanosomatida']
10 OtherAlgae = ['Rhodophyta', 'stramenopiles', 'Cyanophora', 'haptophyta']
11 OtherEukaryota = ['metazoa', 'actinomyc', 'alveolata', 'Monosiga', 'rhizaria',
    'amoebozoa', 'excavata', 'fungi']
12 Prokaryota = ['Archea', 'actinomyc-bact', 'alfa-prot-bact', 'firmicut-bact',
    'gama-prot-bact', 'other-bact', 'spiroch-bact', 'cyano-bact', 'CFB-bact']
13 GreenAlgae = ['green-alga', 'Pyramimonas', 'green-plant']
14
15 for line in Blastylines:
16     firsttab = line.find('\t')
17     contig_name = line[0:firsttab]
18     newline = line[firsttab+1:]
19     secondtab = newline.find('\t')
20     ID = newline[0:secondtab]
21     if out_line.find(contig_name) == -1:
22         outfile.write(out_line)
23         out_line = ''
24         for item in Euglenoida: # Euglenea
25             if line.find(item) > -1:
26                 a = line.find(item)
27                 pskupina = 'Euglenoida'
28         for item in KinDip:
29             if line.find(item) > -1:

```

```

30         pskupina = 'Kinetoplastea Diplonemea'
31     for item in GreenAlgae:
32         if line.find(item)> -1:
33             pskupina = 'Green Algae'
34     for item in OtherAlgae:
35         if line.find(item)> -1:
36             pskupina = 'Other Algae'
37     for item in OtherEukaryota:
38         if line.find(item)> -1:
39             pskupina = 'Other Eukaryota'
40     for item in Prokaryota:
41         if line.find(item)> -1:
42             pskupina = 'Prokaryota'
43     posltab = line.rfind('\t')
44     RF = line[posltab+1:-1]
45     line = line[:posltab]
46     posltab = line.rfind('\t')
47     line = line[:posltab]
48     posltab = line.rfind('\t')
49     evaline = line[posltab+1:]
50     out_line = '\n' + contig_name + ';' + RF + ';' + pskupina + ';' +
ID + ';' + evaline
51     else:
52         for item in Euglenoida:
53             if line.find(item)> -1:
54                 dalsiskupina = 'Euglenoida'
55         for item in GreenAlgae:
56             if line.find(item)> -1:
57                 dalsiskupina = 'Green Algae'
58         for item in KinDip:
59             if line.find(item)> -1:
60                 dalsiskupina = 'Kinetoplastea Diplonemea'
61         for item in OtherAlgae:
62             if line.find(item)> -1:
63                 dalsiskupina = 'Other Algae'
64         for item in OtherEukaryota:
65             if line.find(item)> -1:
66                 dalsiskupina = 'Other Eukaryota'
67         for item in Prokaryota:
68             if line.find(item)> -1:
69                 dalsiskupina = 'Prokaryota'
70         if out_line.find(dalsiskupina) == -1:
71             posltab = line.rfind('\t')
72             RF = line[posltab+1:-1]
73             line = line[:posltab]
74             posltab = line.rfind('\t')
75             line = line[:posltab]
76             posltab = line.rfind('\t')
77             evaline = line[posltab+1:]
78             out_line = out_line + ';' + RF + ';' + dalsiskupina + ';' + ID
+ ';' + evaline

```

```

79 outfile.write(out_line)
80 outfile.close()

```

A.3 Krok šestý

```

1 import os
2 list = []
3
4 if not os.path.isdir ('ChoosenContigs'):
5     os.mkdir ('ChoosenContigs')
6
7 choosen = open('ChoosenContigs.txt').read()
8
9 with open('RhabdomonasWithoutBacteria.lbr') as file:
10     for line in file:
11         contig = line[0:11]
12         if contig in choosen:
13             if contig not in list: # make new file
14                 list.append(contig) # Adds contig to the end of list
15                 ContigFile = open('./ChoosenContigs/' + contig + '.txt', '
w')
16                 ContigFile.write(line)

```

A.4 Krok sedmý

```

1 import glob, string, os, time
2
3 start = time.clock()
4
5 if not os.path.isdir ('ChoosenFasta'):
6     os.mkdir ('ChoosenFasta')
7
8 gencode = {
9     'ATA': 'I', 'ATC': 'I', 'ATT': 'I', 'ATG': 'M', 'ACA': 'T', 'ACC': 'T', 'ACG
': 'T', 'ACT': 'T',
10    'AAC': 'N', 'AAT': 'N', 'AAA': 'K', 'AAG': 'K', 'AGC': 'S', 'AGT': 'S', 'AGA
': 'R', 'AGG': 'R',
11    'CTA': 'L', 'CTC': 'L', 'CTG': 'L', 'CTT': 'L', 'CCA': 'P', 'CCC': 'P', 'CCG
': 'P', 'CCT': 'P',
12    'CAC': 'H', 'CAT': 'H', 'CAA': 'Q', 'CAG': 'Q', 'CGA': 'R', 'CGC': 'R', 'CGG
': 'R', 'CGT': 'R',
13    'GTA': 'V', 'GTC': 'V', 'GTG': 'V', 'GTT': 'V', 'GCA': 'A', 'GCC': 'A', 'GCG
': 'A', 'GCT': 'A',
14    'GAC': 'D', 'GAT': 'D', 'GAA': 'E', 'GAG': 'E', 'GGA': 'G', 'GGC': 'G', 'GGG
': 'G', 'GGT': 'G',
15    'TCA': 'S', 'TCC': 'S', 'TCG': 'S', 'TCT': 'S', 'TTC': 'F', 'TTT': 'F', 'TTA
': 'L', 'TTG': 'L',
16    'TAC': 'Y', 'TAT': 'Y', 'TAA': '*', 'TAG': '*', 'TGC': 'C', 'TGT': 'C', 'TGA
': '*', 'TGG': 'W'}
17
18 def clean_sequence(sequence):

```

```

19     """Given a sequence string, return a crap-free, standardized DNA
    version."""
20     s = sequence.replace( '\r', '' ).split( '\n' )
21     if s[0][0] == '>': s = s[ 1 :]
22     s = ''.join( s )
23     s = s.replace( ' ', '' ).replace( '\t', '' )
24     return s.upper().replace( 'U', 'T' )
25
26 def report_bad_chars(sequence):
27     """Given a string 'sequence', return a dictionary of any non-AGCT
    characters."""
28     bad_chars = {}
29     for l in sequence:
30         if l not in 'AGCT':
31             if l in bad_chars: bad_chars[l] += 1
32             else: bad_chars[ l ] = 1
33     if bad_chars != {}: print(bad_chars)
34
35 def translate(sequence):
36     """Return the translated protein from 'sequence' assuming +1 reading
    frame."""
37     return ''.join([gencode.get(sequence[3*i:3*i+3], 'X') for i in range(
    len(sequence)//3)])
38
39 def translate(sequence):
40     """Return the translated protein from 'sequence' assuming +1 reading
    frame."""
41     return ''.join([gencode.get(sequence[3*i:3*i+3], 'X') for i in range(
    len(sequence)//3)])
42
43 def complement(s):
44     """Return the complementary sequence string."""
45     basecomplement = {'A': 'T', 'C': 'G', 'G': 'C', 'T': 'A', 'a': 't', 'c'
    : 'g', 'g': 'c', 't': 'a' }
46     letters = list(s)
47     letters = [basecomplement[base] for base in letters]
48     return ''.join(letters)
49
50 def reverse(s):
51     """Return the sequence string in reverse order."""
52     letters = list(s)
53     letters.reverse()
54     return ''.join(letters)
55
56 def reversecomplement(s):
57     """Return the reverse complement of the dna string."""
58     s = reverse(s)
59     s = complement(s)
60     return s
61
62 InContigs = glob.glob( 'ChoosenContigs\*.txt' )

```

```

63
64 gi = ''
65 ph = 0
66
67 for contig in InContigs:
68     with open(contig) as file:
69         b = 0
70         f = 0
71         v = 0
72         q = 0
73         OutContigName = (contig[15:-4] + '.fas')
74         print OutContigName
75         OutContig = open('./ChooosenFasta/' + OutContigName, 'w')
76         ReadingFrames = []
77         taxa = []
78         i = -1
79         celkem = 0
80         for line in file:
81             if line.startswith('>'):
82                 celkem += 1
83                 i += 1
84                 r = line.rfind('\t')
85                 rf = line[r:]
86                 RF = int(rf)
87                 ReadingFrames.append(RF)
88 #         print "      Reading Frame: ", RF
89         if q == 0:
90             q = 1
91             with open('Rhabdomonas454Contigs.fna') as rhabdomonas:
92                 dnasequence = ''
93                 for rline in rhabdomonas:
94                     if rline.startswith('>'):
95                         if rline.find(OutContigName[: -4]) > -1:
96                             namesequence = '>Rhabdomonas_' +
OutContigName[6: -4] + '\n'
97                             OutContig.write(namesequence)
98                             flag = 1
99                             else:
100                                 flag = 0
101                             elif flag == 1:
102                                 dnasequence = dnasequence + rline[: -1]
103                             if RF > 0:
104                                 dnasequence2 = dnasequence[RF - 1:]
105                             else:
106                                 complementarydnasequence = reversecomplement(
dnasequence)
107                                 dnasequence2 = complementarydnasequence[-1 - RF:]
108                                 dnasequence1 = clean_sequence(dnasequence2)
109                                 report_bad_chars(dnasequence1)
110                                 OutContig.write(translate(dnasequence1) + '\n')
111                             if ReadingFrames[0] == ReadingFrames[i]:

```

```

112     j = line.rfind('[')
113     if j == -1:
114         if line.find('Monosiga') > -1:
115             taxon = 'Monosiga'
116             ph = 0
117         elif line.find('EuglGrac') > -1:
118             taxon = 'EuglGrac'
119             ph = 0
120         elif line.find('Pyramimonas') > -1:
121             taxon = 'Pyramimonas'
122             ph = 0
123         elif line.find('Cyanophora') > -1:
124             taxon = 'Cyanophora'
125             ph = 0
126         elif line.find('Eutreptiella') > -1:
127             taxon = 'Eutreptiella'
128             phylum = 'Eutreptiella'
129             ph = 1
130         elif line.find('Diplonema') > -1:
131             taxon = 'Diplonema'
132             phylum = 'Diplonema'
133             ph = 1
134         elif line.find('Rhodophyta') > -1:
135             taxon = 'Rhodophyta'
136             phylum = 'Rhodophyta'
137             ph = 1
138         elif line.find('cryptophyta') > -1:
139             taxon = 'cryptophyta'
140             phylum = 'cryptophyta'
141             ph = 1
142         elif line.find('Chlorela') > -1:
143             taxon = 'Chlorela'
144             phylum = 'green-alga'
145             ph = 1
146         elif line.find('trypanosomatida') > -1:
147             taxon = 'trypanosomatida'
148             ph = 0
149         else:
150             print "    Something is wrong! Taxa without
assignment exist."
151             print "    ", line
152             v += 1
153     else:
154         ph = 0
155         k = line.rfind(']')
156         taxon = line[j+1:k]
157     if taxon not in taxa:
158         taxa.append(taxon)
159         x = 12
160         newline = line[12:]
161         y = newline.find('\t')

```

```

162         id = newline[:y]
163         flag = 0
164         exist = 0
165         if ph == 0:
166             p = newline.find('_')
167             phylum = newline[:p]
168             with open('./dbp/' + phylum + '.dbp') as database:
169                 for dbline in database:
170                     if dbline.startswith('>'):
171                         IsThereIG = dbline.find(id)
172                         if IsThereIG > -1:
173                             exist = 1
174                             OutContig.write(dbline)
175                             flag = 1
176                         else:
177                             flag = 0
178                     elif flag == 1:
179                         OutContig.write(dbline)
180             else:
181                 b += 1
182         else:
183             f += 1
184         print "    All contigs: ", celkem
185         print "    No [] :", v
186         print "    Uz bylo ... ", b
187         print "    ORF ... ", f
188     stop = time.clock()
189     print '    start: ', start
190     print '    stop: ', stop
191     print 'duration:', stop - start, ' sec'

```

A.5 Krok osmý

```

1 import glob, string, os, time
2
3 start = time.clock()
4
5 if not os.path.isdir ('RenamedChooosenFasta'):
6     os.mkdir ('RenamedChooosenFasta')
7
8
9
10 InFasta = glob.glob('ChooosenFasta/*.fas')
11
12 gi = ''
13 ph = 0
14
15 for fasta in InFasta:
16     with open(fasta) as file:
17         OutFastaName = ('re' + fasta[13:])
18         print OutFastaName

```

```

19     OutFasta = open( './RenamedChosenFasta/' + OutFastaName, 'w')
20     i = 0
21     for line in file:
22         if line.startswith('>'):
23             i += 1
24             newline = line[1:]
25             p = newline.find('_')
26             phylum = newline[:p]
27             newline = '>' + str(i) + phylum + '\n'
28             OutFasta.write(newline)
29         else:
30             OutFasta.write(line)
31 stop = time.clock()
32 print '    start:', start
33 print '    stop:', stop
34 print 'duration:', stop - start, ' sec'

```

A.6 Krok devátý

A.6.1 Muscle

```

1 import glob, string, os, time
2
3 start = time.clock()
4
5 if not os.path.isdir ( 'AlignedByMuscle' ):
6     os.mkdir ( 'AlignedByMuscle' )
7
8 RenamedFasta = glob.glob( 'RenamedChosenFasta\*.fas' )
9
10 for renamed in RenamedFasta:
11     print renamed
12     OutAlignedNameY = './AlignedByMuscle/' + 'aligned' + renamed
13     [20:-4] + '.phy'
14     OutAlignedNameL = OutAlignedNameY[:-4] + '.log'
15     muscle = 'muscle.exe -in ' + renamed + ' -phyiout ' +
16     OutAlignedNameY + ' -log ' + OutAlignedNameL
17     os.system(muscle)
18 stop = time.clock()
19 print 'duration:', stop - start, ' sec'

```

A.6.2 MAFFT

```

1 import glob, string, os, time
2
3 start = time.clock()
4
5 if not os.path.isdir ( 'AlignedByMAFFT' ):
6     os.mkdir ( 'AlignedByMAFFT' )
7 path = os.getcwd()
8 mafftpath = path + '\mafft-win\mafft.bat'

```



```

9 print 'path = ', path
10 n = len(path)
11 print 'mafftpath = ', mafftpath
12 renameddir = path + '\Renamed\*.fas'
13 besttrees = glob.glob(renameddir)
14
15 for renamed in besttrees:
16     print renamed
17     OutAlignedName = path + '\AlignedByMAFFT\ '[:-1] + renamed[n+9:-6]
18     + 'a.phy'
19     mafft = 'call ' + mafftpath + ' --auto --phylipout --reorder ' +
20     renamed + ' > ' + OutAlignedName
21     os.system(mafft)
22 stop = time.clock()
23 print 'duration:', stop - start, ' sec'

```

A.7 Krok desátý

```

1 import glob, string, os, time
2
3 start = time.clock()
4
5 if not os.path.isdir ('TrimmedByTrimAl'):
6     os.mkdir ('TrimmedByTrimAl')
7
8 Aligned = glob.glob('AlignedByMuscle\*.phy')
9
10 for aligned in Aligned:
11     print aligned
12     OutTrimmed = './TrimmedByTrimAl/' + 'trimmed' + aligned[31:-4] + '
13     .phy'
14     OutTrimmedhtml = './TrimmedByTrimAl/' + 'trimmed' + aligned[31:-4]
15     + '.html'
16     trimal = 'trimal.exe -in ' + aligned + ' -out ' + OutTrimmed + ' -
17     gappyout -htmlout ' + OutTrimmedhtml
18     os.system(trimal)
19 stop = time.clock()
20 print 'duration:', stop - start, ' sec'

```

Bibliografie

- AKHMANOVA, A, F VONCKEN, T van ALLEN, A van HOEK, B BOXMA, G VOGELS, M VEENHUIS a J. H. HACKSTEIN (1998): A Hydrogenosome with a Genome. *Nature* **396**, s. 527–8.
- ANDERSEN, R. A. (2004): Biology and Systematics of Heterokont and Haptophyte Algae. *American Journal of Botany* **91**, s. 1508–1522.
- ANDERSEN, R. A. (2011): *Ochromonas moestrupii* sp nov (Chrysophyceae), a New Golden Flagellate from Australia. *Phycologia* **50**, s. 600–607.
- ANDERSSON, J. O. a A. J. ROGER (2002): A Cyanobacterial Gene in Nonphotosynthetic Protists - an Early Chloroplast Acquisition in Eukaryotes? *Current Biology* **12**, s. 115–119.
- ANGELER, D. G., A. N. MÜLLNER a M. SCHAGERL (1999): Comparative ultrastructure of the cytoskeleton and nucleus of *Distigma* (euglenozoa). *European Journal of Protistology* **35**, s. 309–318.
- BASS, D., D. MOREIRA, P. LÓPEZ-GARCÍA, S. POLET, E. E. CHAO, S. VON DER HEYDEN, J. PAWLOWSKI a T. CAVALIER-SMITH (2005): Polyubiquitin insertions and the phylogeny of Cercozoa and Rhizaria. *Protist* **156**, s. 149–161.
- BERNHARD, J. M. a S. S. BOWSER (1999): Benthic foraminifera of dysoxic sediments: chloroplast sequestration and functional morphology. *Earth-Science Reviews* **46**, s. 149–165.
- BHATTACHARYA, D. a J. M. ARCHIBALD (2006): Response to Theissen and Martin. *Current Biology* **16**, R1017–R1018.
- BHATTACHARYA, D., D. C. PRICE, H. S. YOON, E. C. YANG, N. J. POULTON, R. A. ANDERSEN a S. P. DAS (2012): Single cell genome analysis supports a link between phagotrophy and primary plastid endosymbiosis. *Scientific Reports* **2**, s. 1–8.
- BLOM, D, A DE HAAN, M VAN DEN BERG, P SLOOF, M JIRKU, J LUKES a R BENNE (1998): RNA editing in the free-living bodonid *Bodo saltans*. *Nucleic Acids Research* **26**, s. 1205–1213.

- BODAMMER, J. E. a T. K. SAWYER (1981): Aufwuchs Protozoa and Bacteria on the Gills of the Rock Crab, *Cancer irroratus* Say: A Survey by Light and Electron Microscopy. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* **28**, s. 35–46.
- BODYŁ., A., P. MACKIEWICZ a R. MILANOWSKI (2010): Did trypanosomatid parasites contain a eukaryotic alga-derived plastid in their evolutionary past? *The Journal of parasitology* **96**, s. 465–475.
- BREGLIA, S. A., N. YUBUKI, M. HOPPENRATH a B. S. LEANDER (2010): Ultrastructure and molecular phylogenetic position of a novel euglenozoan with extrusive episymbiotic bacteria: *Bihospites bacati* n. gen. et sp. (Symbiontida). *BMC Microbiology* **10**, s. 145.
- BROWN, M. W., M. KOLISKO, J. D. SILBERMAN a A. J. ROGER (2012): Aggregative Multicellularity Evolved Independently in the Eukaryotic Supergroup Rhizaria. *Current Biology* **22**, s. 1–5.
- BRUGEROLLE, G. (1985): Des trichocystes chez les bodonides, un caractère phylogénétique supplémentaire entre kinetoplastida et euglenida. fre. *Protistologica* **21**, s. 339–348.
- BRUMPT, E a G LAVIER (1924): Um nouvel Euglénien polyflagellé parasite du têtard de *Leptodactylus ocellatus* du Brésil. *Annales de Parasitologie*.
- BUI, E. T., P. J. BRADLEY a P. J. JOHNSON (1996): A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, s. 9651–9656.
- BURKI, F., N. OKAMOTO, J.-F. POMBERT a P. J. KEELING (2012): The evolutionary history of haptophytes and cryptophytes: phylogenomic evidence for separate origins. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**, s. 2246–2254.
- BUSSE, I a A. PREISFELD (2002): Phylogenetic position of *Rhynchopus* sp. and *Diplonema ambulator* as indicated by analyses of euglenozoan small subunit ribosomal DNA. *Gene* **284**, s. 83–91.
- BUSSE, I. a A. PREISFELD (2003a): Application of spectral analysis to examine phylogenetic signal among euglenid SSU rDNA data sets (Euglenozoa). *Organisms Diversity Evolution* **3**, s. 1–12.
- (2003b): Systematics of primary osmotrophic euglenids: a molecular approach to the phylogeny of *Distigma* and *Astasia* (Euglenozoa). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **53**, s. 617–624.
- CAPELLA-GUTIÉRREZ, S., J. M. SILLA-MARTÍNEZ a T. GABALDÓN (2009): trimAl: a tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics (Oxford, England)* **25**, s. 1972–3.
- CARON, D. A., K. G. PORTER a R. W. SANDERS (1990): Carbon, nitrogen, and phosphorus budgets for the mixotrophic phytoflagellate *Poterioochromonas malhamensis* (Chrysophyceae) during bacterial ingestion. *Limnology And Oceanography* **35**, s. 433–443.

- CARPENTER, K. J., R. F. WALLER a P. J. KEELING (2008): Surface morphology of *Saccinobaculus* (Oxymonadida): implications for character evolution and function in oxymonads. *Protist* **159**, s. 209–221.
- CAVALIER-SMITH, T (1981): Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Bio Systems* **14**, s. 461–481.
- (1993): Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiological reviews* **57**, s. 953–994.
- (1995): Zooflagellate phylogeny and classification. *Tsitologiya* **37**, s. 1010–1029.
- (1999): Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *The Journal of eukaryotic microbiology* **46**, s. 347–366.
- (2000): Flagellate megaevolution: the basis for eukaryote evolution. *The Flagellates: Unity, Diversity and Evolution*. Ed. B. S. . C. LEADBEATER a J. C. GREEN. Taylor & Francis, s. 361–390.
- (2002): The phagotrophic origin of eukaryotes and phylogenetic classification of Protozoa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**, s. 297–354.
- CAVALIER-SMITH, T. a E. E.-Y. CHAO (2006): Phylogeny and megasystematics of phagotrophic heterokonts (kingdom Chromista). *Journal of Molecular Evolution* **62**, s. 388–420.
- CHESNICK, J. M., W. H. KOOISTRA, U WELLBROCK a L. K. MEDLIN (1997): Ribosomal RNA analysis indicates a benthic pennate diatom ancestry for the endosymbionts of the dinoflagellates *Peridinium foliaceum* and *Peridinium balticum* (Pyrrophyta). *The Journal of eukaryotic microbiology* **44**, s. 314–320.
- CHOMCZYNSKI, P. a N. SACCHI (2006): The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nature Protocols* **1**, s. 581–585.
- DESCHAMPS, P., E. LARA, W. MARANDE, P. LÓPEZ-GARCÍA, F. EKELEND a D. MOREIRA (2011): Phylogenomic analysis of kinetoplastids supports that trypanosomatids arose from within bodonids.
- DOBELL, C. (1908): The structure and life-history of *Copromonas subtilis*, nov. gen. et nov. spec.: a contribution to our knowledge of the Flagellata. *Quart. J. micr. Sci* **52**, s. 75–120.
- DODGE, J. D. a R. M. CRAWFORD (1969): Observations on the Fine Structure of the Eyespot and Associated Organelles in the Dinoflagellate *Glenodinium Foliaceum*. *J Cell Sci* **5**, s. 479–493.
- DOHLEN, C. D. V., S. KOHLER, S. T. ALSOP a W. R. MCMANUS (2001): Mealybug beta-proteobacterial endosymbionts contain gamma-proteobacterial symbionts. *Nature* **412**, s. 433–436.
- DOOIJES, D., I. CHAVES, R. KIEFT, A. DIRKS-MULDER, W. MARTIN a P. BORST (2000): Base J originally found in Kinetoplastida is also a minor constituent of nuclear DNA of *Euglena gracilis*. *Nucleic Acids Research* **28**, s. 3017–3021.

- DOOLITTLE, W. F. (1998): You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. *Trends in Genetics* **14**, s. 307–311.
- DOUGLAS, S, S ZAUNER, M FRAUNHOLZ, M BEATON, S PENNY, L. T. DENG, X WU, M REITH, T CAVALIER-SMITH a U. G. MAIER (2001): The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. *Nature* **410**, s. 1091–1096.
- DYKOVA, I, I FIALA, J LOM a J LUKES (2003): Perkinsiella amoebae-like endosymbionts of Neoparamoeba spp ., relatives of the kinetoplastid Ichthyobodo. *Protistology* **52**, s. 37–52.
- DYKOVÁ, I., I. FIALA a H. PECKOVÁ (2008): Neoparamoeba spp. and their eukaryotic endosymbionts similar to Perkinsella amoebae (Hollande, 1980): coevolution demonstrated by SSU rRNA gene phylogenies. *European Journal of Protistology* **44**, s. 269–277.
- EDGAR, R. C. (2004): MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research* **32**, s. 1792–7.
- EMBLEY, T. M. (2006): Multiple secondary origins of the anaerobic lifestyle in eukaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences* **361**, s. 1055–67.
- EVANS, L. V., J. A. CALLOW a M. E. CALLOW (1973): Structural And Physiological Studies On The Parasitic Red Alga Holmsella. *New Phytologist* **72**, s. 393–402.
- FAST, N. M., J. C. KISSINGER, D. S. ROOS a P. J. KEELING (2001): Nuclear-encoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids. *Molecular Biology and Evolution* **18**, s. 418–426.
- FELSENSTEIN, J. (1981): Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**, s. 368–376.
- FITZPATRICK, D. A., C. J. CREEVEY a J. O. MCINERNEY (2006): Genome phylogenies indicate a meaningful alpha-proteobacterial phylogeny and support a grouping of the mitochondria with the Rickettsiales. *Molecular Biology and Evolution* **23**, s. 74–85.
- FLEGONTOV, P., M. W. GRAY, G. BURGER a J. LUKEŠ (2011): Gene fragmentation: a key to mitochondrial genome evolution in Euglenozoa? *Current Genetics* **57**, s. 225–232.
- FRANTZ, C, C EBEL, F PAULUS a P IMBAULT (2000): Characterization of trans-splicing in Euglenoids. *Current Genetics* **37**, s. 349–355.
- GADELHA, C., B. WICKSTEAD, W. DE SOUZA, K. GULL a N. Cunha-e SILVA (2005): Cryptic paraflagellar rod in endosymbiont-containing kinetoplastid protozoa. *Eukaryotic Cell* **4**, s. 516–525.
- GAUNT, M. W., M. YEO, I. A. FRAME, J. R. STOTHARD, H. J. CARRASCO, M. C. TAYLOR, S. S. MENA, P. VEAZEY, G. A. J. MILES, N. ACOSTA, A. R. de ARIAS a M. A. MILES (2003): Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature* **421**, s. 936–9.

- GEITLER, L. (1977): Zur Entwicklungsgeschichte der Epithemiaceen: Epithemia, Rhopalodia und Denticula (Diatomophyceae) und ihre vermutlich symbiotischen Sphäroidkörper. *Plant Systematics and Evolution* **128**, s. 259–275.
- GIBSON, W., L. PEACOCK, V. FERRIS, K. WILLIAMS a M. BAILEY (2006): Analysis of a cross between green and red fluorescent trypanosomes. *Biochemical Society Transactions* **34**, s. 557–559.
- GILSON, P. R., V. SU, C. H. SLAMOVITS, M. E. REITH, P. J. KEELING a G. I. MCFADDEN (2006): Complete nucleotide sequence of the chlorarachniophyte nucleomorph: nature's smallest nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, s. 9566–9571.
- GREEN, B. (2004): The Chloroplast Genome of Dinoflagellates – A Reduced Instruction Set? *Protist* **155**, s. 23–31.
- GROYE, F. M. de la (1807): Mémoire sur un nouveau genre de coquille de la famille des Solénoides. *Annales du Muséum d'Histoire naturelle de Paris* **9**, s. 131–139.
- HACKETT, J. D., L. MARANDA, H. S. YOON a D. BHATTACHARYA (2003): Phylogenetic evidence for the cryptophyte origin of the plastid of Dinophysis (Dinophysiales, Dinophyceae). *Journal of Phycology* **39**, s. 440–448.
- HANNAERT, V. a P. A. MICHELS (1994): Structure, function, and biogenesis of glycosomes in kinetoplastida. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **26**, s. 205–212.
- HANNAERT, V., E. SAAVEDRA, F. DUFFIEUX, J.-P. SZIKORA, D. J. RIGDEN, P. A. M. MICHELS a F. R. OPPERDOES (2003): Plant-like traits associated with metabolism of Trypanosoma parasites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, s. 1067–1071.
- HITCHEN, E. T. (1974): The Fine Structure of the Colonial Kinetoplastid Flagellate Cephalothamnium cyclosum Stein. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* **21**, s. 221–231.
- HOEF-EMDEN, K. (2005): Multiple independent losses of photosynthesis and differing evolutionary rates in the genus Cryptomonas (Cryptophyceae): combined phylogenetic analyses of DNA sequences of the nuclear and the nucleomorph ribosomal operons. *Journal of Molecular Evolution* **60**, s. 183–195.
- HOEF-EMDEN, K., B. MARIN a M. MELKONIAN (2002): Nuclear and nucleomorph SSU rDNA phylogeny in the Cryptophyta and the evolution of cryptophyte diversity. *Journal of Molecular Evolution* **55**, s. 161–179.
- HOLLAR, L., J. LUKES a D. A. MASLOV (1998): Monophyly of endosymbiont containing trypanosomatids: phylogeny versus taxonomy. *The Journal of eukaryotic microbiology* **45**, s. 293–297.
- HUANG, J., N. MULLAPUDI, C. A. LANCTO, M. SCOTT, M. S. ABRAHAMSEN a J. C. KISSINGER (2004): Phylogenomic evidence supports past endosymbiosis, intracellular and horizontal gene transfer in Cryptosporidium parvum. *Genome Biology* **5**, R88.

- IMANIAN, B a P. J. KEELING (2007): The dinoflagellates *Durinskia baltica* and *Kryptoperidinium foliaceum* retain functionally overlapping. *BMC Evolutionary Biology* **7**.
- INAGAKI, Y, J. B. DACKS, W. F. DOOLITTLE, K. I. WATANABE a T OHAMA (2000): Evolutionary relationship between dinoflagellates bearing obligate diatom endosymbionts: insight into tertiary endosymbiosis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50 Pt 6**, s. 2075–2081.
- INAGAKI, Y, Y HAYASHI-ISHIMARU, M EHARA, I IGARASHI a T OHAMA (1997): Algae or protozoa: phylogenetic position of euglenophytes and dinoflagellates as inferred from mitochondrial sequences. *Journal of Molecular Evolution* **45**, s. 295–300.
- JANOUSKOVEC, J., A. HORÁK, M. OBORNÍK, J. LUKES a P. J. KEELING (2010): A common red algal origin of the apicomplexan, dinoflagellate, and heterokont plastids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, s. 10949–54.
- KATOH, K., G. ASIMENOS a H. TOH (2009): Multiple alignment of DNA sequences with MAFFT. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **537**, s. 39–64.
- KEELING, P. J. (2010): The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences* **365**, s. 729–748.
- (2013): The number, speed, and impact of plastid endosymbioses in eukaryotic evolution. en. *Annual review of plant biology* **64**, s. 583–607.
- KENT, M. L., R. A. ELSTON, T. A. NERAD a T. K. SAWYER (1987): An Isonema-like flagellate (Protozoa: Mastigophora) infection in larval geoduck clams, *Panope abrupta*. *Journal of Invertebrate Pathology* **50**, s. 221–229.
- KIETHEGA, G. N., M. TURCOTTE a G. BURGER (2011): Evolutionarily Conserved cox1 Trans-Splicing Without cis-Motifs. *Molecular Biology and Evolution* **28**, s. 2425–2428.
- KIM, E. a J. M. ARCHIBALD (2010): Plastid evolution: gene transfer and the maintenance of 'stolen' organelles. *BMC Biology* **8**, s. 73.
- KIM, E., J. S. PARK, A. G. B. SIMPSON, S. MATSUNAGA, M. WATANABE, A. MURAKAMI, K. SOMMERFELD, N. T. ONODERA a J. M. ARCHIBALD (2010): Complex array of endobionts in *Petalomonas sphagnophila*, a large heterotrophic euglenid protist from Sphagnum-dominated peatlands. *The ISME journal* **4**, s. 1108–1120.
- KIM, J. I., W. SHIN a R. E. TRIEMER (2010): Multigene Analyses Of Photosynthetic Euglenoids And New Family, Phacaceae (Euglenales). *Journal of Phycology* **46**, s. 1278–1287.
- KIRKALDY, G. (1903): Miscellanea Rhynchotalia No. 7. *Entomologist* **36**, s. 179–181.
- KIVIC, P. a P. WALNE (1984): An evaluation of a possible phylogenetic relationship between the Euglenophyta and Kinetoplastida. *Evolutionary Protistology*.

- LAATSCH, T, S ZAUNER, B STOEBE-MAIER, K. V. KOWALLIK a U.-G. MAIER (2004): Plastid-derived single gene minicircles of the dinoflagellate *Ceratium horridum* are localized in the nucleus. *Molecular Biology and Evolution* **21**, s. 1318–1322.
- LARA, E., D. MOREIRA, A. VERESHCHAKA a P. LÓPEZ-GARCÍA (2009): Pan-oceanic distribution of new highly diverse clades of deep-sea diplomonads. *Environmental Microbiology* **11**, s. 47–55.
- LARSEN, J. a D. J. PATTERSON (1990): Some flagellates (Protista) from tropical marine sediments. *Journal of Natural History* **24**, s. 801–937.
- LAVAL-PEUTO, M a M FEBVRE (1986): On plastid symbiosis in *Tontonia appendiculariformis* (Ciliophora, Oligotrichina). *Bio Systems* **19**, s. 137–158.
- LAX, G. a A. G. B. SIMPSON (2013): Combining Molecular Data with Classical Morphology for Uncultured Phagotrophic Euglenids (Excavata): A Single-Cell Approach. *The Journal of eukaryotic microbiology*.
- LEANDER, B. S. a M. A. FARMER (2000): Comparative morphology of the euglenid pellicle. I. Patterns of strips and pores. *The Journal of eukaryotic microbiology* **47**, s. 469–479.
- (2001): Comparative morphology of the euglenid pellicle. II. Diversity of strip substructure. *The Journal of eukaryotic microbiology* **48**, s. 202–217.
- LEANDER, B. S. (2004): Did trypanosomatid parasites have photosynthetic ancestors? *Trends in Microbiology* **12**, s. 251–258.
- LEANDER, B. S., H. J. ESSON a S. A. BREGLIA (2007): Macroevolution of complex cytoskeletal systems in euglenids. *BioEssays news and reviews in molecular cellular and developmental biology* **29**, s. 987–1000.
- LEANDER, B. S. a P. J. KEELING (2004): Symbiotic innovation in the oxymonad *Streblospio truxina*. *The Journal of eukaryotic microbiology* **51**, s. 291–300.
- LEEDALE, G. (1967): Euglenoid flagellates. Prentice-Hall.
- LEEDALE, G. a D. HIBBERD (1974): Observations on the cytology and fine structure of the euglenoid genera *Menoidium* Perty and *Rhabdomonas* Fresenius. *Arch. Protistenkd* **116**, s. 319–345.
- LEEDALE, G. F. (1969): Observations on endonuclear bacteria in euglenoid flagellates. *Österreichische botanische Zeitschrift* **116**, s. 279–294.
- LELIAERT, F., D. R. SMITH, H. MOREAU, M. D. HERRON, H. VERBRUGGEN, C. F. DELWICHE a O. DE CLERCK (2012): Phylogeny and Molecular Evolution of the Green Algae. *Critical Reviews in Plant Sciences* **31**, s. 1–46.
- LIM, L. a G. I. MCFADDEN (2010): The evolution, metabolism and functions of the apicoplast. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences* **365**, s. 749–763.
- LIMA, L., F. M. da SILVA, L. NEVES, M. ATTÍAS, C. S. A. TAKATA, M. CAMPANER, W. de SOUZA, P. B. HAMILTON a M. M. G. TEIXEIRA (2012): Evolutionary insights from bat trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *erneyi* sp. nov., in African bats

- closely related to *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and allied species. *Protist* **163**, s. 856–72.
- LIN, S. J., H. A. ZHANG, D. F. SPENCER, J. E. NORMAN a M. W. GRAY (2002): Widespread and extensive editing of mitochondrial mRNAs in dinoflagellates. *Journal of Molecular Biology* **320**, s. 727–739.
- LOMAN, N. J., R. V. MISRA, T. J. DALLMAN, C. CONSTANTINIDOU, S. E. GHARBIA, J. WAIN a M. J. PALLAN (2012): Performance comparison of benchtop high-throughput sequencing platforms. *Nature biotechnology* **30**, s. 434–9.
- MACCONNELL, J. G., M. S. BLUM a H. M. FALES (1970): Alkaloid from fire ant venom: identification and synthesis. *Science* **168**, s. 840–841.
- MAKIUCHI, T., T. ANNOURA, M. HASHIMOTO, T. HASHIMOTO, T. AOKI a T. NARA (2011): Compartmentalization of a glycolytic enzyme in *Diplonema*, a non-kinetoplastid Euglenozoan. *Protist* **162**, s. 482–489.
- MARANDE, W. a G. BURGER (2007): Mitochondrial DNA as a genomic jigsaw puzzle. *Science* **318**, s. 415.
- MARIN, B. a M. MELKONIAN (2010): Molecular phylogeny and classification of the Mamiellophyceae class. nov. (Chlorophyta) based on sequence comparisons of the nuclear- and plastid-encoded rRNA operons. *Protist* **161**, s. 304–336.
- MARIN, B., E. C. M. NOWACK a M. MELKONIAN (2005): A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis. *Protist* **156**, s. 425–432.
- MARIN, B., A. PALM, M. KLINGBERG a M. MELKONIAN (2003): Phylogeny and taxonomic revision of plastid-containing euglenophytes based on SSU rDNA sequence comparisons and synapomorphic signatures in the SSU rRNA secondary structure. *Protist* **154**, s. 99–145.
- MARTIN-CERECEDA, M., E. C. ROBERTS, E. C. WOOTTON, E. BONACCORSO, P. DYAL, A. GUINEA, D. ROGERS, C. J. WRIGHT a G. NOVARINO (2010): Morphology, ultrastructure, and small subunit rDNA phylogeny of the marine heterotrophic flagellate *Goniomonas* aff. *amphinema*. *The Journal of eukaryotic microbiology* **57**, s. 159–170.
- MARUYAMA, S., M. MATSUZAKI, K. MISAWA a H. NOZAKI (2009): Cyanobacterial contribution to the genomes of the plastid-lacking protists. *BMC Evolutionary Biology* **9**, s. 197.
- MASLOV, D. A., S. YASUHIRA a L. SIMPSON (1999): Phylogenetic affinities of *Diplonema* within the Euglenozoa as inferred from the SSU rRNA gene and partial COI protein sequences. *Protist* **150**, s. 33–42.
- MATSUMOTO, T., F. SHINOZAKI, T. CHIKUNI, A. YABUKI, K. TAKISHITA, M. KAWACHI, T. NAKAYAMA, I. INOUE, T. HASHIMOTO a Y. INAGAKI (2011): Green-colored plastids in the dinoflagellate genus *Lepidodinium* are of core chlorophyte origin. *Protist* **162**, s. 268–276.

- McEWAN, M. L. a P. J. KEELING (2004): HSP90, tubulin and actin are retained in the tertiary endosymbiont genome of *Kryptoperidinium foliaceum*. *The Journal of eukaryotic microbiology* **51**, s. 651–659.
- McFADDEN, G. I., P. R. GILSON a S. E. DOUGLAS (1994): The photosynthetic endosymbiont in cryptomonad cells produces both chloroplast and cytoplasmic-type ribosomes. *Journal of Cell Science* **107** (Pt 2, s. 649–657.
- McFADDEN, G. I., P. R. GILSON a D. R. A. HILL (1994): Goniomonas: rRNA sequences indicate that this phagotrophic flagellate is a close relative of the host component of cryptomonads. *European Journal of Phycology* **29**, s. 29–32.
- MERESCHKOWSKY, C (1910): Theorie der zwei Plasmaarten als Grundlage der Symbiogenese, einer neuen Lehre von der Entstehung der Organismen. *Biol. Centralbl.*
- MIGNOT, J. P. (1962): [Study of the cell nucleus of the euglenoid *Scytomonas pusilla* (Stein) during division and copulation]. *Comptes rendus hebdomadaires des séances de l'Académie des sciences* **254**, s. 1864–6.
- MINNHAGEN, S., W. F. CARVALHO, P. S. SALOMON a S. JANSON (2008): Chloroplast DNA content in *Dinophysis* (Dinophyceae) from different cell cycle stages is consistent with kleptoplasty. *Environmental Microbiology* **10**, s. 2411–7.
- MIYOSHI, Y a Y TSUBO (1969): Permanent bleaching of *Euglena* by chloramphenicol. *Plant and Cell Physiology* **10**, s. 221–225.
- MONTÉGUT-FELKNER, A. E. a R. E. TRIEMER (1994): Phylogeny of *Diplonema ambulator* (Larsen and Patterson). *European Journal of Protistology* **30**, s. 227–237.
- MOORE, R. B., M. OBORNÍK, J. JANOUSKOVEC, T. CHRUDIMSKÝ, M. VANCOVÁ, D. H. GREEN, S. W. WRIGHT, N. W. DAVIES, C. J. S. BOLCH, K. HEIMANN, J. SLAPETA, O. HOEGH-GULDBERG, J. M. LOGSDON a D. A. CARTER (2008): A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature* **451**, s. 959–963.
- MOREIRA, D., P. LOPEZ-GARCIA a F. RODRIGUEZ-VALERA (2001): New insights into the phylogenetic position of diplomonads: G+C content bias, differences of evolutionary rate and a new environmental sequence. en. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, s. 2211–2219.
- MOREIRA, D., P. LÓPEZ-GARCÍA a K. VICKERMAN (2004): An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **54**, s. 1861–1875.
- MUCHHAL, U. S. a S. D. SCHWARTZBACH (1992): Characterization of a *Euglena* gene encoding a polyprotein precursor to the light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein of photosystem II. *Plant Molecular Biology* **18**, s. 287–299.
- MULLER, M. (1993): The hydrogenosome. *Journal of General Microbiology* **139**, s. 2879–2889.
- NOWACK, E. C. M., M. MELKONIAN a G. GLÖCKNER (2008): Chromatophore genome sequence of *Paulinella* sheds light on acquisition of photosynthesis by eukaryotes. *Current Biology* **18**, s. 410–418.

- OBORNÍK, M., D. MODRÝ, M. LUKEŠ, E. CERNOTÍKOVÁ-STĚPÁNKOVÁ, J. CIHLÁŘ, M. TESÁŘOVÁ, E. KOTABOVÁ, M. VANCOVÁ, O. PRÁŠIL a J. LUKEŠ (2012): Morphology, ultrastructure and life cycle of *Vitrella brassicaformis* n. sp., n. gen., a novel chromerid from the Great Barrier Reef. *Protist* **163**, s. 306–23.
- OKAMOTO, N., C. CHANTANGSI, A. HORÁK, B. S. LEANDER a P. J. KEELING (2009): Molecular Phylogeny and Description of the Novel Katablepharid *Roombia truncata* gen. et sp. nov., and Establishment of the Hacrobia Taxon nov. *PLoS ONE* **4**. Ed. J. E. STAJICH, s. 11.
- OKAMOTO, N. a I. INOUE (2006): *Hatena arenicola* gen. et sp. nov., a katablepharid undergoing probable plastid acquisition. *Protist* **157**, s. 401–419.
- OPPERDOES, F. R. a P. A. M. MICHELS (2007): Horizontal gene transfer in trypanosomatids. *Trends in Parasitology* **23**, s. 470–476.
- PRECHTL, J., C. KNEIP, P. LOCKHART, K. WENDEROTH a U.-G. MAIER (2004): Intracellular spheroid bodies of *Rhopalodia gibba* have nitrogen-fixing apparatus of cyanobacterial origin. *Molecular Biology and Evolution* **21**, s. 1477–1481.
- PREISFELD, A., I. BUSSE, M. KLINGBERG, S. TALKE a H. G. RUPPEL (2001): Phylogenetic position and inter-relationships of the osmotrophic euglenids based on SSU rDNA data, with emphasis on the Rhabdomonadales (Euglenozoa). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, s. 751–758.
- PRESTON, T. (1976): Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. *Biology of the Kinetoplastida*. Academic Press, s. 35–130.
- REVILL, M. J. W., S. STANLEY a J. M. HIBBERD (2005): Plastid genome structure and loss of photosynthetic ability in the parasitic genus *Cuscuta*. *Journal of Experimental Botany* **56**, s. 2477–2486.
- REYES-PRieto, A., A. MOUSTAFA a D. BHATTACHARYA (2008): Multiple genes of apparent algal origin suggest ciliates may once have been photosynthetic. *Current Biology* **18**, s. 956–962.
- RICE, D. W. a J. D. PALMER (2006): An exceptional horizontal gene transfer in plastids: gene replacement by a distant bacterial paralog and evidence that haptophyte and cryptophyte plastids are sisters. *BMC Biology* **4**, s. 31.
- RIISBERG, I., R. J. S. ORR, R. KLUGE, K. SHALCHIAN-TABRIZI, H. A. BOWERS, V. PATIL, B. EDVARDSEN a K. S. JAKOBSEN (2009): Seven gene phylogeny of heterokonts. *Protist* **160**, s. 191–204.
- ROBERTS, L. a J. JANOVY (2008): Foundations of Parasitology. McGraw-Hill, s. 728.
- ROGER, A. J., C. G. CLARK a W. F. DOOLITTLE (1996): A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, s. 14618–14622.
- ROGERS, M. B., P. R. GILSON, V. SU, G. I. MCFADDEN a P. J. KEELING (2007): The complete chloroplast genome of the chlorarachniophyte *Bigeloviella natans*: evidence for independent origins of chlorarachniophyte and euglenid secondary endosymbionts. *Molecular Biology and Evolution* **24**, s. 54–62.

- ROGOZIN, I. B., M. K. BASU, M. CSÜRÖS a E. V. KOONIN (2009): Analysis of rare genomic changes does not support the unikont-bikont phylogeny and suggests cyanobacterial symbiosis as the point of primary radiation of eukaryotes. *Genome biology and evolution* **2009**, s. 99–113.
- RUMPHO, M. E., J. M. WORFUL, J. LEE, K. KANNAN, M. S. TYLER, D. BHATTACHARYA, A. MOUSTAFA a J. R. MANHART (2008): Horizontal gene transfer of the algal nuclear gene psbO to the photosynthetic sea slug *Elysia chlorotica*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, s. 17867–17871.
- SAGAN, L (1967): On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology* **14**, s. 255–274.
- SÁNCHEZ PUERTA, M. V., T. R. BACHVAROFF a C. F. DELWICHE (2004): The complete mitochondrial genome sequence of the haptophyte *Emiliania huxleyi* and its relation to heterokonts. *DNA research an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* **11**, s. 1–10.
- (2005): The complete plastid genome sequence of the haptophyte *Emiliania huxleyi*: a comparison to other plastid genomes. *DNA research an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* **12**, s. 151–156.
- SANCHEZ-PUERTA, M. V., J. C. LIPPMEIER, K. E. APT a C. F. DELWICHE (2007): Plastid genes in a non-photosynthetic dinoflagellate. *Protist* **158**, s. 105–117.
- SCHIMPER, A. (1883): Ueber die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper (Nachtrag). *Botanische Zeitung* **41**, s. 105–160.
- SCHNEPF, E a M ELBRACHTER (1988): Cryptophyceyan-like double membrane-bound chloroplast in the Dinoflagellate, *Dinophysis Ehrenb.*: evolutionary, phylogenetic and toxicological implications. *Botanica Acta* **101**, s. 196–203.
- SCHNEPF, E. (1994): Light and Electron Microscopical Observations in *Rhynchopus coscinodiscivorus* spec. nov., a Colorless, Phagotrophic Euglenozoon with Concealed Flagella). *Archiv für Protistenkunde* **144**, s. 63–74.
- SCHNEPF, E., I. SCHLEGEL a D. HEPPERLE (2002): *Petalomonas sphagnophila* (Euglenophyta) and its endocytobiotic cyanobacteria: A unique form of symbiosis. *Phycologia* **41**, s. 153–157.
- SCHWARTZ, R. M. a M. O. DAYHOFF (1978): Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. *Science* **199**, s. 395–403.
- SIMPSON, A. G. B., E. E. GILL, H. A. CALLAHAN, R. W. LITAKER a A. J. ROGER (2004): Early evolution within kinetoplastids (euglenozoa), and the late emergence of trypanosomatids. *Protist* **155**, s. 407–422.
- SIMPSON, A. G. B., J. LUKES a A. J. ROGER (2002): The evolutionary history of kinetoplastids and their kinetoplasts. *Molecular Biology and Evolution* **19**, s. 2071–83.

- SIMPSON, A. G. B. a A. J. ROGER (2004): Protein phylogenies robustly resolve the deep-level relationships within Euglenozoa. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **30**, s. 201–212.
- SIMPSON, A. G. B., J. R. STEVENS a J. LUKES (2006): The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in Parasitology* **22**, s. 168–174.
- SKUJA, H. (1948): Taxonomie des Phytoplanktons einiger Seen in Uppland, Schweden. ger.
- STAMATAKIS, A., P. HOOVER a J. ROUGEMONT (2008): A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Systematic biology* **57**, s. 758–71.
- STELTER, K., N. M. EL-SAYED a F. SEEGER (2007): The expression of a plant-type ferredoxin redox system provides molecular evidence for a plastid in the early dinoflagellate *Perkinsus marinus*. *Protist* **158**, s. 119–130.
- STOECKER, D. K. (1999): Mixotrophy among Dinoflagellates. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* **46**, s. 397–401.
- STURM, N. R., D. A. MASLOV, E. C. GRISARD a D. A. CAMPBELL (2001): Diplonema spp. possess spliced leader RNA genes similar to the Kinetoplastida. *The Journal of eukaryotic microbiology* **48**, s. 325–331.
- SUTTON, R. E. a J. C. BOOTHROYD (1986): Evidence for Trans splicing in trypanosomes. *Cell* **47**, s. 527–535.
- TAKAHASHI, F., Y. OKABE, T. NAKADA, H. SEKIMOTO, M. ITO, H. KATAOKA a H. NOZAKI (2007): Origins of the secondary plastids of Euglenophyta and Chlorarachniophyta as revealed by an analysis of the plastid-targeting, nuclear-encoded gene *psbO*. *Journal of Phycology* **43**, s. 1302–1309.
- TENGs, T., O. J. DAHLBERG, K. SHALCHIAN-TABRIZI, D. KLAVENESS, K. RUDI, C. F. DELWICHE a K. S. JAKOBSEN (2000): Phylogenetic analyses indicate that the 19'Hexanoyloxy-fucoxanthin-containing dinoflagellates have tertiary plastids of haptophyte origin. *Molecular Biology and Evolution* **17**, s. 718–729.
- THAO, M. L., P. J. GULLAN a P. BAUMANN (2002): Secondary (gamma-Proteobacteria) Endosymbionts Infect the Primary (beta-Proteobacteria) Endosymbionts of Mealybugs Multiple Times and Coevolve with Their Hosts. *Society* **68**, s. 3190–3197.
- THEISSEN, U. a W. MARTIN (2006): The difference between organelles and endosymbionts. *Current Biology* **16**, R1016–7; author reply R1017–8.
- THOMPSON, J. D., T. J. GIBSON a D. G. HIGGINS (2002): Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]* **Chapter 2**, Unit 2.3.
- TOSO, M. A. a C. K. OMOTO (2007): Gregarina niphandrodes may lack both a plastid genome and organelle. *The Journal of eukaryotic microbiology* **54**, s. 66–72.
- TRIEMER, R. E. a D. W. OTT (1990): Ultrastructure of Diplonema ambulator larsen & patterson (euglenozoa) and its relationship to Isonema. *European journal of protistology* **25**, s. 316–20.

- TRIEMER, R. a M. FARMER (1991a): An ultrastructural comparison of the mitotic apparatus, feeding apparatus, flagellar apparatus and cytoskeleton in euglenoids and kinetoplastids. *The Cytoskeleton of Flagellate and Ciliate Protists*. Springer London, s. 91–104.
- (1991b): The ultrastructural organization of the heterotrophic euglenids and its evolutionary implications. *The biology of free-living heterotrophic flagellates*. Clarendon Press Oxford, s. 185–204.
- TRIPODI, K. E. J., L. V. BUTTIGLIERO, S. G. ALTABE a A. D. UTTARO (2006): Functional characterization of front-end desaturases from trypanosomatids depicts the first polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway from a parasitic protozoan. *The FEBS journal* **273**, s. 271–280.
- TURMEL, M., M.-C. GAGNON, C. J. O'KELLY, C. OTIS a C. LEMIEUX (2009): The chloroplast genomes of the green algae *Pyramimonas*, *Monomastix*, and *Pycnococcus* shed new light on the evolutionary history of prasinophytes and the origin of the secondary chloroplasts of euglenids. *Molecular biology and evolution* **26**, s. 631–648.
- TÝC, J., S. LONG, M. JIRKŮ a J. LUKES (2010): YCF45 protein, usually associated with plastids, is targeted into the mitochondrion of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **173**, s. 43–47.
- TYLER, B. M., S. TRIPATHY, X. ZHANG, P. DEHAL, R. H. Y. JIANG, A. AERTS, F. D. ARREDONDO, L. BAXTER, D. BENSASSON, J. L. BEYNON, J. CHAPMAN, C. M. B. DAMASCENO, A. E. DORRANCE, D. DOU, A. W. DICKERMAN, I. L. DUBCHAK, M. GARBELOTTO, M. GIJZEN, S. G. GORDON, F. GOVERS, N. J. GRUNWALD, W. HUANG, K. L. IVORS, R. W. JONES, S. KAMOUN, K. KRAMPIS, K. H. LAMOUR, M.-K. LEE, W. H. McDONALD, M. MEDINA, H. J. G. MEIJER, E. K. NORDBERG, D. J. MACLEAN, M. D. OSPINA-GIRALDO, P. F. MORRIS, V. PHUNTUMART, N. H. PUTNAM, S. RASH, J. K. C. ROSE, Y. SAKIHAMA, A. A. SALAMOV, A. SAVIDOR, C. F. SCHEURING, B. M. SMITH, B. W. S. SOBRAL, A. TERRY, T. A. TORTO-ALALIBO, J. WIN, Z. XU, H. ZHANG, I. V. GRIGORIEV, D. S. ROKHSAR a J. L. BOORE (2006): *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* **313**, s. 1261–1266.
- VAN DER AUWERA, G, C. J. B. HOFMANN, P DE RIJK a R DE WACHTER (1998): The Origin of Red Algae and Cryptomonad Nucleomorphs: A Comparative Phylogeny Based on Small and Large Subunit rRNA Sequences of *Palmaria palmata*, *Gracilaria verrucosa*, and the *Guillardia theta* Nucleomorph. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **10**, s. 333–342.
- VICKERMAN, K (1991): Organization of the bodonid flagellates. *The biology of free-living heterotrophic flagellates*. Clarendon Press Oxford, s. 159–176.
- VOLF, P. a J. SADLOVA (2009): Sex in *Leishmania*. en. *Science (New York, N.Y.)* **324**, s. 1644.

- VON DER HEYDEN, S., E. E. CHAO, K. VICKERMAN a T. CAVALIER-SMITH (2004): Ribosomal RNA phylogeny of bodonid and diplomonad flagellates and the evolution of euglenozoa. *The Journal of eukaryotic microbiology* **51**, s. 402–416.
- WALLIN, I. (1923): The mitochondria problem. *The American Naturalist* **57**, s. 255–261.
- (1927): Symbiogenesis and the Origin of Species. Williams & Wilkins Company.
- WAYLAND, F. C. (1964): Some observations on *Scytomonas pusilla* and *S. klebsii*. *J. Protozool.*
- WENRICH, D. H. (1924): Studies on *Euglenamorphia hegneri* n. g., n. sp., a Euglenoid Flagellate Found in Tadpoles. *Biol. Bull.* **47**, s. 149–1741.
- WILLIAMS, K. P. a B. W. SOBRAL (2007): A Robust Species Tree for the Alphaproteobacteria. *Journal of bacteriology*.
- WISECAVER, J. H. a J. D. HACKETT (2010): Transcriptome analysis reveals nuclear-encoded proteins for the maintenance of temporary plastids in the dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *BMC Genomics* **11**, s. 366.
- YAMAGUCHI, A., N. YUBUKI a B. S. LEANDER (2012): Morphostasis in a novel eukaryote illuminates the evolutionary transition from phagotrophy to phototrophy: description of *Rapaza viridis* n. gen. et sp. (Euglenozoa, Euglenida). *BMC Evolutionary Biology* **12**, s. 29.
- YAMAGUCHI, T a O. R. ANDERSON (1994): Fine structure of laboratory cultured *Distigma proteus* and cytochemical localization of acid phosphatase. *Journal of Morphology* **219**, s. 89–99.
- YANG, E. C., G. H. BOO, H. J. KIM, S. M. CHO, S. M. BOO, R. A. ANDERSEN a H. S. YOON (2012): Supermatrix data highlight the phylogenetic relationships of photosynthetic stramenopiles. *Protist* **163**, s. 217–31.
- YASUHIRA, S a L. SIMPSON (1997): Phylogenetic affinity of mitochondria of *Euglena gracilis* and kinetoplastids using cytochrome oxidase I and hsp60. *Journal of Molecular Evolution* **44**, s. 341–347.
- YOON, H. S., J. D. HACKETT, C. CINIGLIA, G. PINTO a D. BHATTACHARYA (2004): A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* **21**, s. 809–818.
- YOON, H. S., T. NAKAYAMA, A. REYES-PIRETO, R. A. ANDERSEN, S. M. BOO, K.-i. ISHIDA a D. BHATTACHARYA (2009): A single origin of the photosynthetic organelle in different Paulinella lineages. *BMC Evolutionary Biology* **9**, s. 98.
- YUBUKI, N., V. P. EDGECOMB, J. M. BERNHARD a B. S. LEANDER (2009): Ultrastructure and molecular phylogeny of *Calkinsia aureus*: cellular identity of a novel clade of deep-sea euglenozoans with epibiotic bacteria. *BMC Microbiology* **9**, s. 16.
- YUBUKI, N., T. NAKAYAMA a I. INOUE (2008): a Unique Life Cycle and Perennation in a Colorless Chrysophyte *Spumella* Sp. *Journal of Phycology* **44**, s. 164–172.
- YUBUKI, N., A. G. B. SIMPSON a B. S. LEANDER (2012): Reconstruction of the feeding apparatus in *Postgaardia mariagerensis* provides evidence for character evolution within the Symbiontida (Euglenozoa). *European journal of protistology*, s. 1–8.

-
- ZAHALSKY, A. C., S. H. HUTNER, M. KEANE a R. M. BURGER (1962): Bleaching *Euglena gracilis* with antihistamines and streptomycin-type antibiotics. *Archiv für Mikrobiologie* **42**, s. 46–55.
- ZHANG, Z, B. R. GREEN a T CAVALIER-SMITH (1999): Single gene circles in dinoflagellate chloroplast genomes. *Nature* **400**, s. 155–159.
- ZHU, G, J. S. KEITHLY a H PHILIPPE (2000): What is the phylogenetic position of *Cryptosporidium*? *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **50 Pt 4**, s. 1673–1681.
- ZIMBA, P. V., P. D. MOELLER, K. BEAUCHESNE, H. E. LANE a R. E. TRIEMER (2010): Identification of euglenophycin—a toxin found in certain euglenoids. *Toxicon official journal of the International Society on Toxinology* **55**, s. 100–104.